
Estudio de la función del gen *perdido*
en la musculatura de *Drosophila melanogaster*



Tesis Doctoral
Juan José Pérez-Moreno

Universidad Pablo de Olavide
Sevilla, 2015

Imagen de portada: micrografía confocal de músculos dorsales del abdomen de *Drosophila melanogaster* que expresan *perdido* ARNi. Las proteínas sarcoméricas Zasp y MHC aparecen marcadas en verde y rojo respectivamente.

Imagen de contraportada: micrografía de la región torácica y abdominal de un ejemplar de *Drosophila melanogaster* cuya musculatura expresa la proteína GFP (*mef2-GAL4 > UAS-CD8-GFP*).



Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad Pablo de Olavide

Estudio de la función del gen *perdido* en la musculatura de *Drosophila melanogaster*

Memoria de Tesis presentada por Juan José Pérez Moreno para optar al grado de Doctor por
la Universidad Pablo de Olavide. Tesis inscrita en el Programa de Doctorado en
Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química.

Directora:

Beatriz Estrada Martín

Tutor:

José Ignacio Ibeas Corcelles

Codirectora:

María Dolores Martín Bermudo

Sevilla. 2015



Este trabajo ha sido realizado en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (Universidad Pablo de Olavide-Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Junta de Andalucía), y ha sido financiado por:

- Proyecto de Investigación de Excelencia con título “Estudio de las interacciones célula-matriz extracelular en el mantenimiento de células troncales y en el control de la migración e invasión celular”. Código de referencia: P09-CVI-5058. Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo. Junta de Andalucía.

- Proyecto del Plan Nacional I+D de Investigación con título “Reconocimiento celular, adhesión y mantenimiento de la unión músculo-tendón en moscas y pez cebra”. Código de referencia: BFU2011-26745. Ministerio de Ciencia e Innovación. Gobierno de España.

La Dra. Beatriz Estrada Martín, contratada postdoctoral de la Universidad Pablo de Olavide, en calidad de Directora, y la Dra. María Dolores Martín Bermudo, Científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en calidad de Codirectora, así como José Ignacio Ibeas Corcelles, Profesor Titular de la Universidad Pablo de Olavide, en calidad de Tutor, certifican que:

El trabajo realizado por el doctorando Juan José Pérez Moreno titulado “Estudio de la función del gen *perdido* en la musculatura de *Drosophila melanogaster*”, ha sido realizado bajo su dirección y supervisión, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad necesarias para constituir una Tesis doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.

Directora:

Beatriz Estrada Martín

Tutor:

José Ignacio Ibeas Corcelles

Codirectora:

María Dolores Martín Bermudo

A Tomás y Maru

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

APF: tras la formación de la pupa (del inglés “after puparium formation”)

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ARN interferente

ATP: adenosín trifosfato (del inglés “adenosine triphosphate”)

bHLH: motivo estructural proteico hélice-bucle-hélice básica (del inglés “basic helix-loop-helix”)

βGal: β-Galactosidasa

CF: célula fundadora

Cno: Canoe

CSPG: proteoglicano de condroitín sulfato (del inglés “chondroitin sulfate proteoglycan”)

Dlg5: Discs large 5

DTT: ditioneitol

Duf: Dumbfounded

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

EDTA: ácido etildiaminotetraacético (del inglés “ethylenediaminetetraacetic acid”)

EGTA: ácido etilenglicoltetraacético (del inglés “ethyleneglycoltetraacetic acid”)

EGF-R: receptor de factores de crecimiento epidérmico (del inglés “epidermal growth factor receptor”)

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés “fibroblast growth factor”)

GFP: proteína verde fluorescente (del inglés “Green fluorescent protein”)

GRIP: proteína de unión al receptor del glutamato (del inglés “glutamate receptor interacting protein”)

HRP: peroxidasa de rábano (del inglés “horseradish peroxidase”)

LanB1: Laminina β1

MCF: mioblasto competente para fusión

MDL: músculo torácico dorsolongitudinal

MEC: matriz extracelular

MOPS: ácido 3-(N-morfolín)propanosulfónico

PBS: tampón fosfato alcalino (del inglés “phosphate buffer saline”)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)

Perd/Kon: Perdido/Kon-tiki

PLM: músculo persistente larvario (del inglés “persistent larval muscle”)

qPCR: PCR cuantitativa (del inglés “quantitative polymerase chain reaction”)

RPL32: proteína ribosomal L32 (del inglés “ribosomal protein L32”)

Scrib: scribble

TBE: tampón Tris-Borato-EDTA

TGF-β: factor de crecimiento transformante β (del inglés “transformant growth factor beta”)

Tris: tris-hidroximetil-aminometano

Tropo: Tropomiosina

UAS: secuencia de activación corriente arriba (del inglés “upstream activation sequence”)

UMT: unión miotendinosa

UNM: unión neuromuscular

Vkg: Viking (colágeno tipo IV)

VL: músculo embrionario ventrolongitudinal

ÍNDICE

RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	19
EL TEJIDO MUSCULAR	21
<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DEL TEJIDO MUSCULAR	22
DESARROLLO DE LA MUSCULATURA ESQUELÉTICA/SOMÁTICA	23
ESTRUCTURA DE LA MIOFIBRILLA: EL SARCÓMERO	28
EL PROCESO DE MIOFIBRILOGÉNESIS	31
DESARROLLO DE LA MUSCULATURA SOMÁTICA DE <i>DROSOPHILA</i>	34
• DESARROLLO DE LA MUSCULATURA SOMÁTICA EMBRIONARIA DE <i>DROSOPHILA</i>	35
• DESARROLLO DE LA MUSCULATURA SOMÁTICA ADULTA DE <i>DROSOPHILA</i>	38
EL GEN PERDIDO/KON-TIKI	44
• PERD EN EL DESARROLLO DE LA MUSCULATURA EMBRIONARIA DE <i>DROSOPHILA</i>	45
• NG2 EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE MAMÍFEROS	46
• MECANISMOS MOLECULARES DE PERD/NG2	47
OBJETIVOS	51
RESULTADOS	55
1. PERD EN LA MIOGÉNESIS ADULTA	57
1.1. PERD SE REQUIERE PARA EL DESARROLLO DE LA MUSCULATURA ADULTA	57
1.2. PERD SE REQUIERE PARA LA MIGRACIÓN Y SEGREGACIÓN DE LOS MIOTUBOS ADULTOS	63
1.3. LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE PERD NO AFECTA A LA ESPECIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS FUNDADORAS NI A LA FUSIÓN DE LOS MIOBLASTOS	65
1.4. PERD SE REQUIERE PARA LA MIOFIBRILOGÉNESIS	67
1.5. LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE PERD AFECTA A LA ORGANIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA SARCOMÉRICA	72
1.6. PERD SE REQUIERE DE MANERA ESPECÍFICA PARA LA MIOFIBRILOGÉNESIS	79
1.7. LA FUNCIÓN DE PERD EN MIOFIBRILOGÉNESIS ES INDEPENDIENTE DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE ADHESIÓN DE INTEGRINAS	82

1.8. LOCALIZACIÓN DE PERD EN LOS MÚSCULOS ADULTOS	87
1.9. PERD SE REQUIERE PARA EL DESARROLLO DE LA UNIÓN NEUROMUSCULAR	91
1.10. PERD SE REQUIERE PARA EL MANTENIMIENTO DE LA UNIÓN MIOTENDINOSA DE LOS MÚSCULOS PERSISTENTES LARVARIOS	97
2. PERD EN EL MANTENIMIENTO DEL TEJIDO MUSCULAR	99
2.1. PERD SE REQUIERE PARA EL MANTENIMIENTO DE LA FUNCIÓN MUSCULAR	99
2.2. PERD SE REQUIERE PARA EL MANTENIMIENTO DE LA UNIÓN MIOTENDINOSA	101
3. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE PERD DURANTE LA MIOGÉNESIS	104
3.1. INTERACCIONES A NIVEL INTRACELULAR	104
3.1.1. BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS PDZ CANDIDATAS A INTERACCIONAR CON PERD	105
3.1.2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS PDZ CANDIDATAS	107
3.2. INTERACCIONES A NIVEL EXTRACELULAR	109
3.2.1. <i>PERD</i> Y <i>LANB1</i> INTERACCIONAN GENÉTICAMENTE DURANTE LA FORMACIÓN DE LA UNIÓN MIOTENDINOSA EMBRIONARIA	110
3.2.2. <i>PERD</i> Y <i>LANB1</i> INTERACCIONAN GENÉTICAMENTE DURANTE LA MIGRACIÓN DE LA MUSCULATURA EMBRIONARIA HACIA EL TENDÓN.	113
3.2.3. <i>PERD</i> NO ES ESENCIAL PARA LA ACUMULACIÓN DE LAMININA EN LA UNIÓN MIOTENDINOSA	116
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	141
MATERIAL Y MÉTODOS	145
GENÉTICA	147
• CEPAS DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	147
• GENERACIÓN DE CROMOSOMAS RECOMBINANTES	148
• SISTEMA UAS/GAL4/GAL80	151
INMUNOHISTOQUÍMICA	153
• TINCIÓN DE EMBRIONES	153
• TINCIÓN DE PUPA/ADULTO	155
• ANTICUERPOS Y MICROSCOPIA	158
ENSAYO DE CAPACIDAD DE ESCALADA	159
PCR CUANTITATIVA (qPCR)	160

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	164
BIBLIOGRAFÍA	167
AGRADECIMIENTOS	189
ANEXO	195

Resumen

El desarrollo del tejido muscular esquelético es un proceso multietapa donde tienen lugar diversos procesos celulares, incluyendo especificación de células mesodérmicas a mioblastos, proliferación y fusión de mioblastos, migración y anclaje de las células multinucleadas resultantes con las células del tendón, y diferenciación en miofibra. Durante este último paso, en el músculo se ensamblan unas estructuras citoesqueléticas denominadas miofibrillas, que proporcionan su capacidad contráctil. Aunque la estructura del tejido muscular ha sido estudiada de manera exhaustiva, los mecanismos moleculares responsables de su unión al tendón y su diferenciación no están bien definidos. Considerando la alta incidencia de patologías musculares congénitas, conocer en detalle estos procesos resulta de especial interés para el desarrollo de nuevas terapias. Usando *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, este trabajo se ha centrado principalmente en el estudio de la función del gen *perdido* (*perd*) durante el desarrollo muscular. *perd* codifica un proteoglicano transmembrana (Perd), ortólogo del receptor de mamíferos NG2. Estudios previos han demostrado que Perd se requiere para la adhesión del músculo al tendón durante el desarrollo de algunos músculos embrionarios de *Drosophila*. En esta tesis, se ha estudiado la función de Perd en el desarrollo de la musculatura adulta mediante herramientas genéticas que permiten reducir de manera específica los niveles de Perd en la musculatura. De este modo, se ha observado que Perd se requiere no solo para la guía de los músculos adultos hacia las células del tendón y su adhesión con estas, sino que además, se requiere específicamente para el ensamblaje de las miofibrillas y la formación de la unión neuromuscular. Además, una vez finalizado el desarrollo, Perd se requiere también para el mantenimiento u homeostasis del músculo. Finalmente, en este trabajo se han estudiado los mecanismos moleculares responsables de la función de Perd mediante la búsqueda de proteínas que interaccionan con Perd.

Introducción

El tejido muscular

La mayoría de los organismos del reino animal presentan unos tejidos especializados denominados músculos, que permiten realizar funciones tales como el movimiento corporal, mantenimiento de la postura, producción de calor o la actividad motora de los órganos internos. Aunque existen diferentes tipos de musculatura, todas ellas se caracterizan por su capacidad de generar movimiento mediante un sistema contráctil de actomiosina (Steinmetz et al., 2012). En base a su estructura, en vertebrados se pueden diferenciar principalmente dos tipos de músculos: el músculo liso y el músculo estriado. El primero funciona de forma no voluntaria y se encuentra, entre otros órganos, en las paredes del aparato digestivo o de los vasos sanguíneos. Por otra parte, el músculo estriado se caracteriza por presentar un patrón de bandeo transversal repetido a lo largo de toda su estructura (Fig. 1). La existencia de este bandeo se debe a la organización del músculo estriado en sarcómeros, que son las unidades mínimas funcionales contráctiles de estos músculos. Dentro de la musculatura estriada se puede distinguir el músculo cardíaco, localizado en las paredes del corazón y cuyo control es involuntario, y el músculo esquelético, que es el responsable de los movimientos activos o conscientes del animal (Fig. 1) (Taylor, 2006).

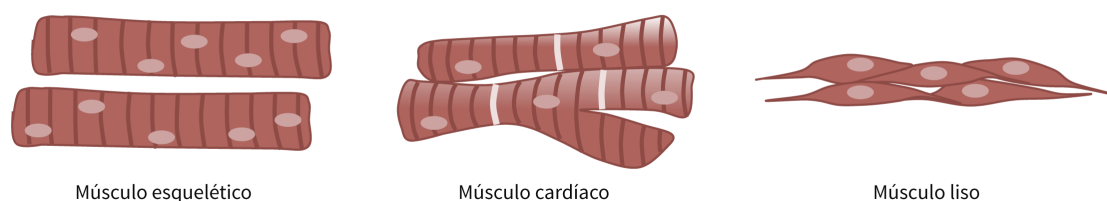


Figura 1

Tipos de células musculares encontradas en vertebrados. Las células musculares esqueléticas, multinucleadas y estriadas, ejecutan los movimientos voluntarios. Las células musculares cardíacas, uninucleadas y estriadas, permiten el movimiento autónomo del corazón. Finalmente, las células musculares lisas, unicelulares y sin estriación transversal, realizan la función contráctil de las paredes de algunos órganos internos como el tubo digestivo o los vasos sanguíneos.

El estudio del desarrollo y homeostasis de la musculatura es de especial interés para comprender el funcionamiento de ciertos procesos biológicos como son la fusión y la migración celular, la sinapsis, o el ensamblaje del citoesqueleto. Pero además, la identificación de la maquinaria molecular responsable de tales procesos puede proporcionar nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades musculares. En humanos se han descrito, además de múltiples tipos de cardiomiopatías (Harvey and Leinwand, 2011), más de 30 enfermedades congénitas que causan una degeneración progresiva del músculo esquelético (Davies and Nowak, 2006). La naturaleza de tales patologías es muy heterogénea, estando involucrados un gran número de genes y procesos celulares (Rahimov and Kunkel, 2013). En este sentido, los estudios realizados en sistemas animales modelo como el ratón (*Mus musculus*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el nematodo (*Caenorhabditis elegans*) o el pez cebra (*Danio rerio*) han contribuido notablemente a la comprensión de los mecanismos moleculares responsables de la degeneración muscular (Berger and Currie, 2012; Demontis et al., 2013a; Kanagawa and Toda, 2006; Sparrow et al., 2008).

***Drosophila melanogaster* como sistema modelo para el estudio del tejido muscular**

Desde principios del siglo XX, la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) ha sido uno de los modelos de experimentación animal más usados para el estudio de diversos procesos biológicos, principalmente aquellos relacionados con la genética y la biología del desarrollo. Por un lado, *Drosophila* resulta un modelo ventajoso gracias a su sencillo mantenimiento y su ciclo biológico de corta duración (≈ 10 días), que además produce una elevada progenie. Por otra parte, su genoma ha sido ampliamente estudiado, mostrando un bajo nivel de redundancia, lo que facilita los análisis de pérdida de función génica. Además, presenta un alto grado de conservación con humanos a nivel de secuencias codificantes, siendo un buen modelo para el estudio de los mecanismos moleculares de múltiples enfermedades. De hecho, el 75 % de los genes responsables de enfermedades humanas están conservados en

Drosophila (Bier, 2005). La gran cantidad de trabajo experimental realizado con este modelo ha permitido el desarrollo de una alta variedad de técnicas y herramientas que facilitan su manipulación genética y molecular (Dahmann, 2008). Específicamente, el empleo de *Drosophila* como sistema modelo, ha proporcionado una gran cantidad de información y conocimiento sobre la biología del músculo (Abmayr and Pavlath, 2012; Ciglar and Furlong, 2009; Demontis et al., 2013a; Maqbool and Jagla, 2007; Sparrow et al., 2008). En *Drosophila* existen tres tipos principales de musculatura: la somática, la cardíaca y la visceral, que son equivalentes respectivamente, a la musculatura esquelética, cardíaca y lisa de vertebrados. Existiendo además, un alto grado de conservación entre los componentes estructurales de las células musculares entre *Drosophila* y vertebrados (Steinmetz et al., 2012; Vigoreaux, 2005).

Desarrollo de la musculatura esquelética/somática

Cada músculo del cuerpo de un animal presenta una serie de características específicas como son su forma, tamaño, posición o propiedades fisiológicas. El desarrollo de un patrón muscular concreto, depende de una serie de eventos que deben estar coordinados de manera precisa. En los distintos organismos estudiados, este proceso comienza durante el desarrollo embrionario, donde el mesodermo se va dividiendo progresivamente en diferentes regiones que originan los progenitores de cada tipo de musculatura (Taylor, 2006). El desarrollo muscular o miogénesis, comienza con la especificación y proliferación de estos precursores musculares a mioblastos. Algunos mioblastos se diferencian en cardiomiocitos y acabarán formando posteriormente el corazón, otros mioblastos formarán la musculatura lisa/visceral que recubre los órganos internos, y una tercera población de mioblastos dará lugar a la musculatura esquelética/somática.

En líneas generales el desarrollo de los músculos somáticos de *Drosophila* ocurre de manera similar al desarrollo de los músculos esqueléticos de vertebrados (Taylor, 2006). En ambos casos se observa un proceso multietapa que incluye al menos los siguientes eventos: especificación de células mesodérmicas a mioblastos, proliferación y fusión de mioblastos,

migración y anclaje de las células multinucleadas resultantes con las células del tendón, y diferenciación en miofibra (Fig. 2). Tanto en el desarrollo de algunos músculos de vertebrados (músculos de las extremidades) como de *Drosophila* (músculos adultos dorsales abdominales), los mioblastos sufren además un proceso de migración tras su especificación (Bryson-Richardson and Currie, 2008; Currie and Bate, 1991). A nivel molecular, en vertebrados el proceso de especificación y diferenciación del músculo esquelético es controlado principalmente por una familia de factores de transcripción tipo bHLH (del inglés “basic helix-loop-helix”) denominados factores reguladores miogénicos. A esta familia pertenecen Myf5, MyoD, MRF4 y Miogenina. Myf5 y MyoD actúan principalmente controlando

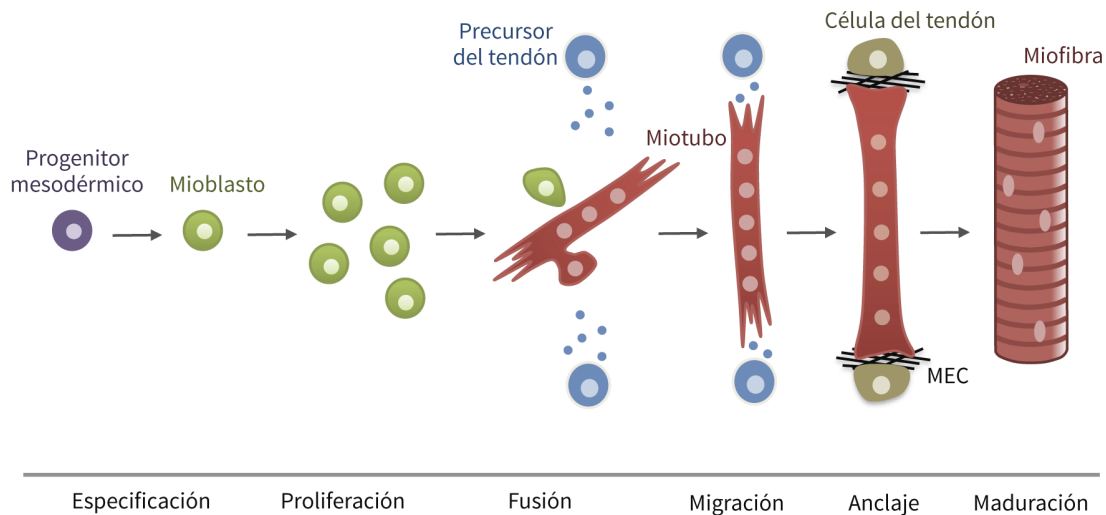


Figura 2

Etapas generales del desarrollo de la fibra muscular esquelética/somática. Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, el mesodermo se subdivide en diferentes poblaciones celulares, algunas de las cuales se diferencian en mioblastos. Estos mioblastos proliferan y se fusionan formando miotubos sincitiales. Posteriormente, los miotubos migran hacia las células precursoras del tendón, que segregan moléculas atrayentes o de guía (puntos azules). La adhesión entre el miotubo y las células precursoras del tendón, que es mediada por la matriz extracelular (MEC), conduce a la diferenciación final de ambos tipos celulares. Posteriormente, el miotubo se convierte en fibra muscular o miofibra mediante el ensamblaje de miofibrillas, lo que le proporciona su capacidad contráctil.

la especificación de los mioblastos, mientras que MRF4 y Miogenina, junto con factores de transcripción de la familia Mef2, regulan las últimas etapas de la diferenciación, desde la fusión de los mioblastos hasta la miofibrillogénesis (Bryson-Richardson and Currie, 2008; Jang and Baik, 2013; Perry and Rudnick, 2000). En *Drosophila*, el factor de transcripción de tipo bHLH Twist, actúa de manera análoga a los factores reguladores miogénicos de vertebrados, regulando la especificación de los mioblastos que originan la musculatura somática (Taylor, 2006). Además, de manera similar a sus ortólogos de vertebrados, el único factor de transcripción Mef2 existente en *Drosophila*, controla la expresión de genes involucrados en los procesos de fusión de mioblastos y en la diferenciación estructural de los músculos somáticos (Bour et al., 1995; Bryantsev et al., 2012; Soler et al., 2012).

Posteriormente a la especificación de los precursores mesodérmicos, los mioblastos proliferan y se fusionan entre sí, formando células multinucleadas o sincitios conocidos como miotubos (Fig. 2). La adición de mioblastos al miotubo en desarrollo conlleva un incremento del tamaño celular y va a determinar el tamaño del miotubo. Estos eventos de fusión son dependientes de moléculas relacionadas con el reconocimiento y la adhesión celular, así como la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina (Abmayr and Pavlath, 2012). Paralelamente a la fusión de los mioblastos, el miotubo en formación migra y se extiende por ambos extremos hacia las células precursoras del tendón. En este sentido, tanto en vertebrados como en *Drosophila* se ha identificado la existencia de moléculas segregadas por los precursores del tendón que actúan como quimioatrayentes del miotubo (Schnorrer and Dickson, 2004) (Fig. 2). Una vez que ambos extremos del músculo alcanzan las células precursoras del tendón, establece con ellas una unión estable de tipo hemiadherente (Fig. 2).

La unión músculo-tendón o unión miotendinosa (UMT) está compuesta por diversos componentes de la matriz extracelular (MEC) como colágeno, Perlecan y laminina, y por receptores transmembrana como el distroglicano o las integrinas. Estos receptores establecen complejos proteicos que conectan la MEC con el citoesqueleto del músculo. Las integrinas, que son receptores heterodiméricos, están además extensamente relacionadas con la regulación de rutas de señalización intracelular, y en el caso de *Drosophila* están presentes tanto en la membrana del músculo como en la del tendón (Bökel and Brown,

2002). Por un lado, la UMT proporciona el anclaje del músculo al esqueleto (o al exoesqueleto en el caso de invertebrados), pero además esta unión se requiere para la diferenciación final del músculo y del tendón. En *Drosophila* así como en la mayoría de los tejidos de vertebrados, la diferenciación final de las células del tendón depende de señales proporcionadas por el músculo. En el caso de vertebrados, la capacidad del músculo esquelético para inducir la diferenciación del tendón está relacionada con la producción de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs, del inglés “fibroblast growth factors”) y factores de crecimiento transformantes β (TGF- β , del inglés “transformant growth factor beta”). En *Drosophila* se ha observado que el músculo somático produce señales que activan la diferenciación del tendón a través del receptor de factores de crecimiento epidérmico (EGF-R, del inglés “epidermal growth factor receptor”) (Schweitzer et al., 2010).

Finalmente, tiene lugar la diferenciación del miotubo en fibra muscular o miofibra (Schnorrer and Dickson, 2004; Weitkunat and Schnorrer, 2014; Zammit et al., 2006) (Fig. 2). Esta diferenciación implica un incremento del tamaño del músculo mediante el ensamblaje de miofibrillas, unas estructuras especializadas del citoesqueleto cuya unidad básica es el sarcómero, compuesto fundamentalmente por el ensamblaje de filamentos de actina y miosina, proporcionando al músculo su capacidad contráctil. En los músculos diferenciados, las miofibrillas quedan unidas entre sí lateralmente mediante adhesiones localizadas de manera principal a nivel de la banda Z de los sarcómeros. En el caso de las miofibrillas más externas o periféricas, las bandas Z quedan ancladas a la MEC a través de los costámeros, unas estructuras de adhesión dependientes de integrinas localizadas en el sarcolema (membrana plasmática muscular) (Fig. 3). De este manera, los costámeros junto a la UMT, proporcionan el soporte mecánico necesario para soportar las fuerzas de tensión producidas durante la contracción muscular (Ervasti, 2003). Se ha propuesto que estas fuerzas son requeridas para la diferenciación de la estructura sarcomérica (Sparrow and Schöck, 2009). La contractibilidad del músculo esquelético/somático es controlada por las neuronas motoras o motoneuronas, las cuales inervan el músculo durante la diferenciación de miotubo a miofibra, estableciendo múltiples sinapsis a lo largo de la superficie del sarcolema. Esta unión entre la neurona motora y el músculo se denomina unión neuromuscular (UNM) (Kummer et al., 2006; Sanes and Lichtman, 2001) (Fig. 3). Además de controlar la actividad muscular, la innervación ha mostrado tener un papel importante en el

desarrollo de algunos músculos, participando en procesos como la proliferación de los mioblastos y la diferenciación estructural del músculo. Esto ha sido observado tanto en las últimas etapas del desarrollo embrionario de vertebrados (Condon et al., 1990; Hoh, 1991), como en la miogénesis de la musculatura somática adulta de *Drosophila* (Currie and Bate, 1995; Fernandes and Keshishian, 1998).

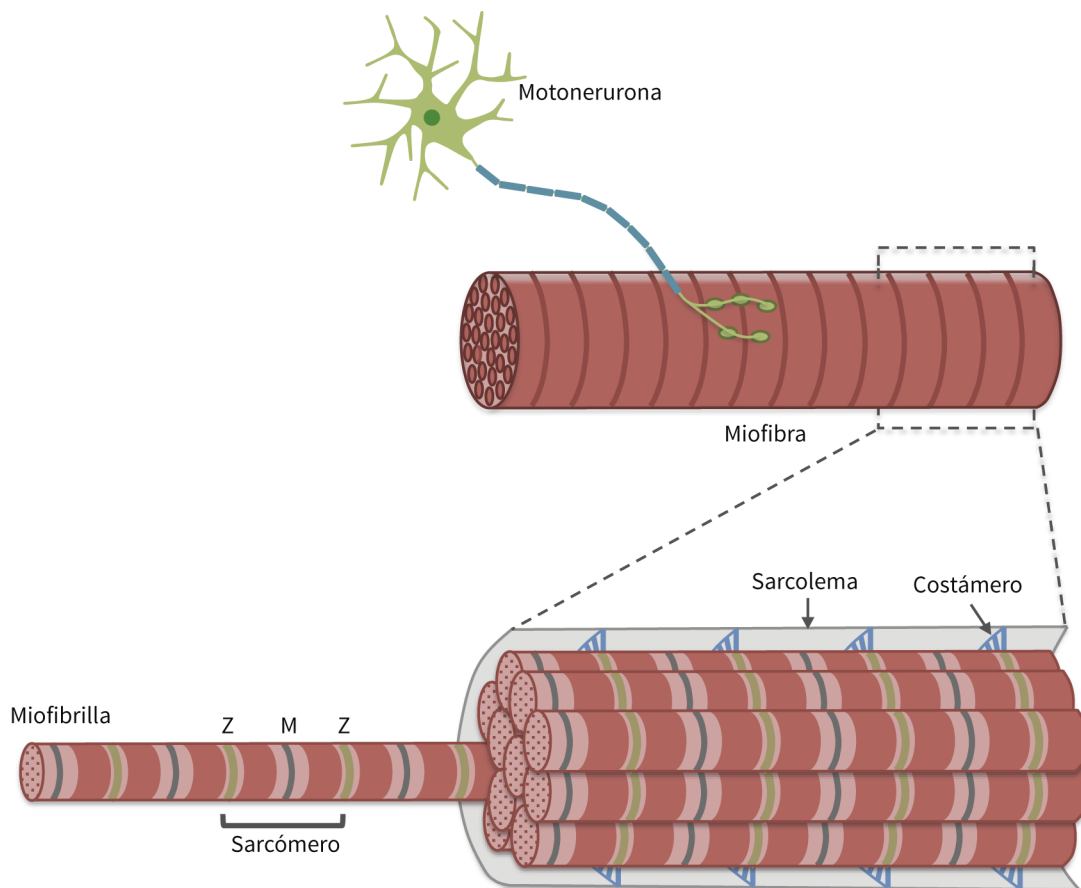


Figura 3

Estructura básica de la fibra muscular esquelética/somática. Una vez finalizado su desarrollo, el interior de la miofibrila aparece ocupado por miofibrillas. Estas estructuras se alinean entre sí lateralmente, formando un bloque que se ancla a la MEC por ambos extremos mediante la UMT (no representada en la figura) y lateralmente mediante los costámeros (representados en azul). Cada miofibrilla está organizada en sarcómeros, las mínimas unidades funcionales contráctiles, que permiten el acortamiento o extensión de la miofibrilla en el eje longitudinal. Esta función contráctil es regulada por la actividad sináptica de unas neuronas especializadas denominadas motoneuronas. Z: banda Z del sarcómero; M: línea M del sarcómero.

En el caso de vertebrados, algunas células mesodérmicas progenitoras de la musculatura esquelética quedan en estado quiescente una vez finalizado el desarrollo del animal. Estas células, denominadas células satélite, permanecen alojadas entre el sarcolema y la membrana basal que rodea cada miofibra, y son estimuladas postnatalmente por el daño muscular o el ejercicio. De este modo se induce su proliferación, diferenciación en mioblastos, y su fusión al músculo para repararlo o incrementar su tamaño (Abmayr and Pavlath, 2012; Bryson-Richardson and Currie, 2008). Aunque en *Drosophila* no se han hallado evidencias de la existencia de ningún tipo de células progenitoras musculares en el adulto, el laboratorio de K. Jagla ha propuesto a las células precursoras de la musculatura adulta de *Drosophila* como modelo de estudio de las células satélite de vertebrados (Daczewska et al., 2010). Estas células, al igual que las células satélite de vertebrados, se mantienen indiferenciados y quiescentes tras el desarrollo embrionario, iniciando posteriormente el proceso de miogénesis (apartado desarrollo de la musculatura somática de *Drosophila*).

Estructura de la miofibrilla: el sarcómero

La funcionalidad de la célula muscular reside en su capacidad contráctil, siendo la miofibrilla la estructura que realiza directamente esta actividad. Por tanto, la carencia de miofibrillas o la degradación de su estructura conlleva defectos en la funcionalidad del músculo (Davies and Nowak, 2006; Piccirillo et al., 2014). La estructura y fisiología de las miofibrillas se ha estudiado extensamente, aportando información relevante en diferentes ámbitos como la cardiología (Boateng and Goldspink, 2008; Harvey and Leinwand, 2011), la ciencia del deporte (Thompson, 2002), el tratamiento de las distrofias musculares (Laing et al., 2011), o el envejecimiento (Demontis et al., 2013b). La mayoría de los componentes que forman las miofibrillas han sido identificados y caracterizados (Au, 2004), estando altamente conservados evolutivamente (Steinmetz et al., 2012). Como se ha descrito anteriormente, las miofibrillas de los músculos estriados están organizadas en sarcómeros, la mínima unidad funcional contráctil del músculo, siendo cada miofibrilla el resultado del alineamiento longitudinal de multitud de sarcómeros (Fig. 3). La estructura sarcomérica

consta de varios complejos macromoleculares altamente organizados entre si. Esta estructura se describe a continuación de manera general (Fig. 4):

Cada sarcómero está delimitado a cada lado por un disco o banda Z, que se comparte con el sarcómero vecino (Fig. 4). Los discos Z están formados por una gran variedad de proteínas diferentes como por ejemplo α -actinina o Zasp, y son las estructuras responsables de mantener los sarcómeros alineados y transmitir la tensión durante los eventos de contracción. Como ya se ha mencionado, los discos Z representan el principal sitio de unión entre las propias miofibrillas, y entre estas y el sarcolema a nivel de la UMT y los costámeros.

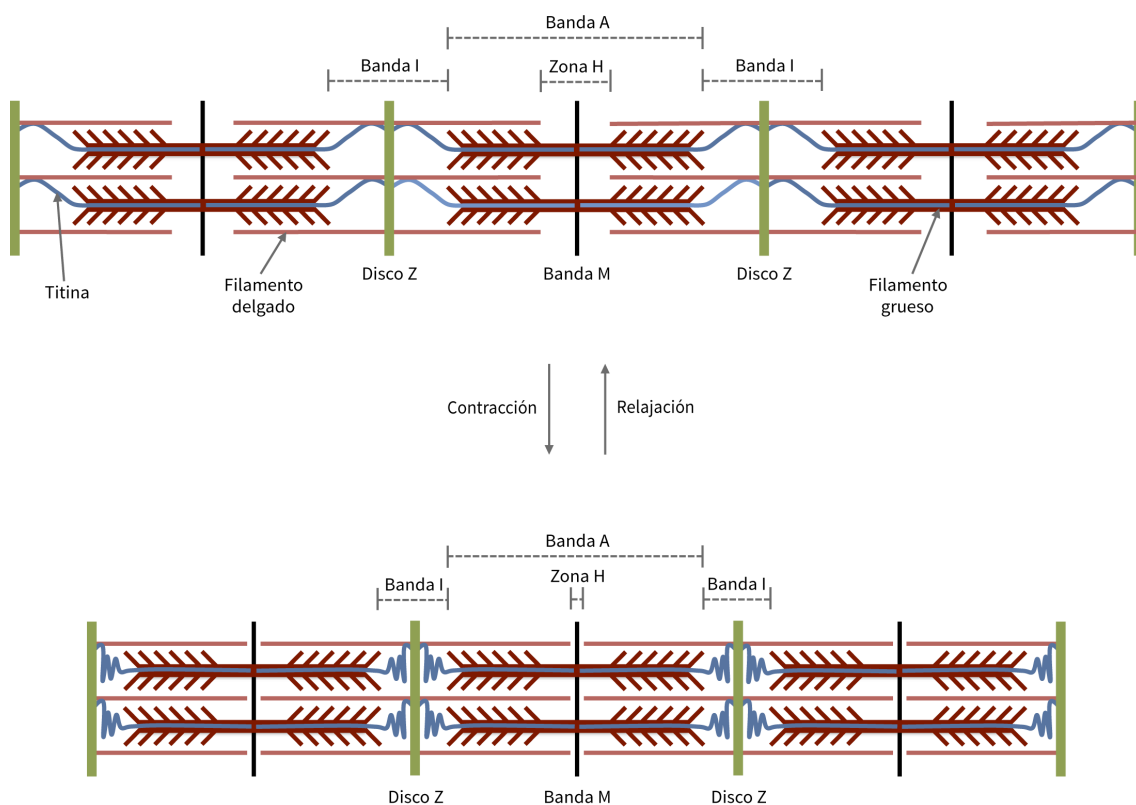


Figura 4

Estructura básica del sarcómero durante la contracción y relajación muscular. En el esquema se representan tres unidades sarcoméricas. En estado relajado o de reposo, el sarcómero presenta su máxima longitud, observándose una zona H claramente definida y la Titina totalmente extendida. Durante la contracción, las cabezas de miosina de los filamentos gruesos avanzan por los filamentos delgados. Esto provoca un acercamiento de los discos Z y los filamentos delgados de cada lado del sarcómero, reduciéndose la longitud de la banda I y la banda H. Paralelamente, los dominios elásticos de la Titina se contraen.

INTRODUCCIÓN

Anclados a los discos Z están los filamentos delgados, formados por filamentos de F-actina y el complejo Troponina-Tropomiosina. Los filamentos delgados se extienden longitudinalmente desde los discos Z hasta la región central de sarcómero. A la región ocupada exclusivamente por los filamentos delgados que salen hacia ambos lados de la banda Z, y por tanto pertenecientes a sarcómeros vecinos, se la denomina banda I (Fig. 4). Debido a que el disco Z está situado en el centro de esta estructura, a menudo se denomina como complejo I-Z-I a la estructura formada del disco Z y los filamentos delgados. El espacio que queda entre el extremo de los filamentos delgados provenientes cada lado del sarcómero se denomina zona H (Fig. 4).

Por otra parte se encuentran los filamentos gruesos, que están compuestos por un complejo de filamentos de miosina. La región ocupada por estos filamentos se denomina banda A (Fig. 4). Los filamentos de miosina se organizan de tal manera que las cabezas de las cadenas pesadas de la miosina quedan orientadas hacia los filamentos de actina de cada lado del sarcómero. En la región central de la banda A, coincidente con la parte central del sarcómero, se encuentra la banda M (Fig. 4), compuesta de varias proteínas como la Miomesina o la proteína M, y cuya principal función es la de mantener unidos y alineados los filamentos gruesos.

La contracción muscular sucede como resultado del avance, mediado por ATP, de las cabezas de la miosina a lo largo del filamento de actina en dirección a los discos Z, lo que a su vez va produciendo el acortamiento del sarcómero. La interacción entre la actina y la miosina es controlada por el complejo Troponina-Tropomiosina, que en situación de reposo mantiene bloqueados los lugares de unión a la actina. Cuando la motoneurona transmite el impulso eléctrico a la membrana muscular, se produce una liberación de calcio al sarcoplasma (citoplasma del músculo) que conlleva que el complejo Troponina-Tropomiosina deje expuestos los sitios de unión entre la actina y la miosina, produciéndose la contracción muscular.

Por tanto, en el sarcómero existen dos complejos macromoleculares principales: uno formado por el disco Z y los filamentos delgados, y otro por la banda M y los filamentos gruesos. Para unir físicamente ambos complejos y permitir que la estructura global esté

correctamente alineada durante la contracción se encuentra la Titina, que en el caso de vertebrados llega a conectar el disco Z a la banda M, siendo la proteína más grande conocida. El ortólogo de *Drosophila*, codificado por el gen *sallimus*, es de menor tamaño y se extiende desde el disco Z hasta la región distal de los filamentos gruesos (Bullard et al., 2005). La Titina presenta dominios estructurales con capacidad elástica, que varían su conformación durante la contracción y relajación del sarcómero. Además, la Titina regula el ensamblaje y longitud de los filamentos gruesos, gracias a la elasticidad de algunos de sus dominios.

El proceso de miofibrillogénesis

A pesar del detallado conocimiento que existe sobre la estructura de las miofibrillas, aún se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que regulan su formación. De hecho, actualmente no existe consenso en la comunidad científica sobre cuales son las etapas generales de este proceso, más allá del hecho aceptado de que las primeras miofibrillas diferenciadas aparecen cerca del sarcolema, en la periferia del músculo (Boateng and Goldspink, 2008; Sanger et al., 2005). En base a los estudios científicos realizados en diferentes organismos, así como en cultivos celulares, actualmente existen dos modelos principales que describen el proceso de miofibrillogénesis:

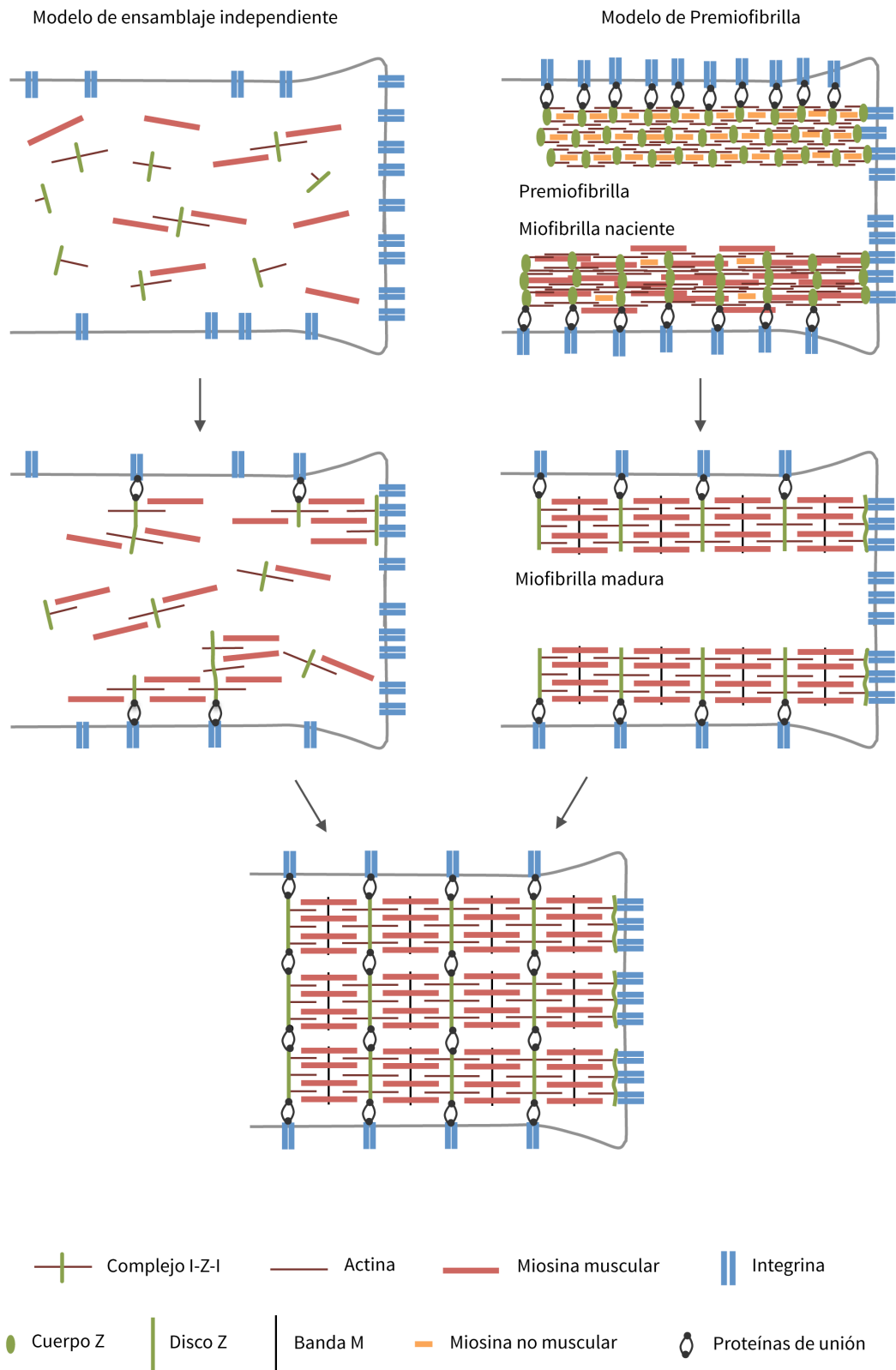
Modelo de ensamblaje independiente: este modelo propuesto inicialmente por Holtzer y colaboradores (Holtzer et al., 1997) sugiere que los sarcómeros se forman como resultado del ensamblaje de distintas subunidades originadas de manera independiente (Fig. 5). Las primeras evidencias que apoyan esta idea se observaron en musculatura somática de *Drosophila* (Beall et al., 1989) y en cultivos de células musculares cardíacas de vertebrados (Lu et al., 1992; Schultheiss et al., 1990), mostrando la formación de filamentos gruesos en ausencia de filamentos delgados y la formación de complejos I-Z-I en ausencia de filamentos gruesos. De este modo, el modelo propone que el complejo I-Z-I y los filamentos gruesos se forman en regiones separadas del sarcoplasma y de manera independiente. Otras proteínas como la Titina, desempeñarían una función de unión y alineamiento entre

los complejos I-Z-I y los filamentos gruesos, promoviendo su ensamblaje en miofibrillas maduras. Recientemente, un estudio realizado en *Drosophila* (Rui et al., 2010) ha permitido la ampliación del modelo. En este estudio, se propone que las integrinas costaméricas actúan como puntos de anclaje para los complejos I-Z-I, proporcionando las tensiones que permiten el correcto alineamiento de los filamentos gruesos y delgados.

El modelo de premiofibrilla: propuesto por Sanger y colaboradores (Rhee et al., 1994; Sanger et al., 2005), y posteriormente apoyado por otros autores (Sparrow and Schöck, 2009), propone un proceso de tres etapas en el que la miofibrilla va madurando hasta alcanzar su estructura final (Fig. 5). De este modelo se han encontrado evidencias en cardiomiocitos de pollo (Rhee et al., 1994), músculo esquelético de pez cebra (Sanger et al., 2009), musculatura somática de *C. elegans* (Hresko et al., 1994), músculo esquelético de ratón (Schwander et al., 2003) y en musculatura somática de *Drosophila* (Reedy and Beall, 1993a; Volk et al., 1990). En primer lugar, en regiones cercanas al sarcolema, tendría lugar la formación de las denominadas premiofibrillas. Estas estructuras se caracterizan por la presencia de filamentos de miosina no muscular y unos complejos I-Z-I prematuros, en los que filamentos de actina de poca longitud aparecen anclados a los cuerpos Z. Los cuerpos Z se definen como agregados de α -actinina y serían los precursores de los discos Z. A continuación, las premiofibrillas van incorporando Titina y filamentos solapantes de miosina muscular, al tiempo que los sarcómeros van incrementando su longitud. En esta etapa, denominada miofibrilla naciente, también se observa como los cuerpos Z comienzan a fusionarse, formando discos

Figura 5

Principales modelos propuestos para el proceso de miofibrillogénesis. De acuerdo al modelo de ensamblaje independiente, los complejos I-Z-I se forman de manera independiente a los filamentos gruesos o de miosina. Los costámeros junto a otras moléculas como la Titina, permiten el correcto ensamblaje y alineamiento de toda la estructura. Por otra parte, el modelo de premiofibrilla postula el desarrollo conjunto de toda la estructura miofibrilar en tres etapas claramente diferenciadas: premiofibrilla: caracterizada por cuerpos Z de aspecto punteado, pequeños filamentos de actina y filamentos de miosina de tipo no muscular; miofibrilla naciente: caracterizada por presencia de Titina (no representada), miosina muscular y no muscular, cuerpos Z fusionados e incremento de la longitud sarcomérica; miofibrilla madura: caracteriza por incremento final de la longitud sarcomérica y el alineamiento de los discos Z y de los filamentos de miosina en bandas A. En ambos modelos se produce un establecimiento paralelo del patrón de los costámeros y de los sarcómeros.



Z. Finalmente, las miofibrillas alcanzan su estado de madurez, caracterizado por el reemplazo de toda la miosina no muscular por miosina muscular, la organización de estos filamentos en bandas A, el incremento final de la longitud sarcomérica y el establecimiento de un disco Z alineado. Durante la etapa de maduración de miofibrilla naciente a miofibrilla, las estructuras son desplazadas al interior de la célula, y nuevas premiofibrillas son ensambladas en la periferia, estableciéndose uniones a nivel de los discos Z entre las miofibrillas.

Debido a que las primeras miofibrillas son detectadas en la periferia de la célula, y que las integrinas son esenciales para el proceso de miofibrillogénesis, dentro del modelo de premiofibrilla se ha propuesto que los sitios de nucleación de los primeros componentes de las miofibrillas son los sitios de adhesión dependientes de integrinas, denominados protocostámeros (Sparrow and Schöck, 2009) o precostámeros (Quach and Rando, 2006). Las premiofibrillas van madurando de forma paralela a los precostámeros, formándose finalmente miofibrillas ancladas a la MEC a través de costámeros diferenciados (Quach and Rando, 2006). Tal y como se ha descrito, actualmente no está claro como ocurre la diferenciación del músculo en miofibrilla, pero sobre todo se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que controlan este proceso. El empleo de sistemas modelo como *Drosophila*, que ya han demostrado su utilidad en este sentido, podrían ayudar a descifrar dichos mecanismos.

Desarrollo de la musculatura somática de *Drosophila*

Durante el ciclo biológico de *Drosophila* se produce el desarrollo de dos musculaturas somáticas diferentes: la musculatura embrionaria, que incrementa su tamaño durante los estadios larvarios y acaba siendo histolizada en su mayor parte durante la metamorfosis, y la musculatura adulta, formada durante dicha fase de metamorfosis. La musculatura embrionaria es unifibrilar (cada músculo consta de una única miofibrilla multinucleada) y regular en cuanto a fisiología y estructura, mientras que de manera similar a los músculos

esqueléticos de vertebrados, la mayoría de los músculos somáticos adultos de *Drosophila* son multifibrilares y diversos en cuanto a sus propiedades y funcionalidad (Taylor, 2006).

• **Desarrollo de la musculatura somática embrionaria de *Drosophila***

En cada hemisegmento del embrión de *Drosophila* se establece un patrón muscular somático definido, compuesto por hasta 30 músculos en el caso de los hemisegmentos A2-A7 (Bate, 1990) (Fig. 6A y A'). Cada uno de estos músculos presenta unas propiedades características como su posición, tamaño, forma o inervación. El desarrollo de esta musculatura es independiente de la inervación nerviosa (Broadie and Bate, 1993), y su formación comienza en los primeros estadios del desarrollo embrionario, una vez formado el mesodermo. El desarrollo embrionario de *Drosophila* ha sido subdividido en 17 estadios (Bate and Arias, 1993). Desde el estadio 5 hasta el estadio 10 se produce la determinación de parte del mesodermo como mesodermo somático, caracterizado por presentar altos niveles del factor miogénico Twist (Baylies and Bate, 1996).

A continuación, entre los estadios 10 y 12 tiene lugar la especificación de los diferentes tipos de mioblastos (Fig. 6). Dentro de mesodermo somático, algunos grupos de células comienzan a expresar el gen *lethal of scute* (Carmena et al., 1995). Mediante un proceso de inhibición lateral mediado por Delta y Notch, la expresión de *lethal of scute* queda restringida a una sola célula en cada grupo celular (Carmena et al., 2002). Estas células se diferencian en progenitores musculares, mientras que el resto de mioblastos acabarán especificándose como mioblastos competentes para fusionar (MCFs). Cada progenitor muscular se divide asimétricamente, dando lugar a dos células fundadoras (CFs), y en ciertos casos a una CF y a un precursor de la musculatura adulta. El resultado de esta división depende de la distribución de las proteínas Numb (represor de Notch) e Inscuteable, de manera que en algunos casos tras la división del progenitor muscular, una de las células hijas no recibe Numb y consecuentemente se activa la ruta de Notch, manteniendo la expresión de *twist* y formando un precursor de la musculatura adulta (Carmena et al., 1998; Ruiz-Gómez and Bate, 1997). De este modo, mientras que los precursores de la musculatura

INTRODUCCIÓN

adulta mantienen altos niveles de Twist hasta el inicio del desarrollo de la musculatura adulta, aquellas células que reciben Numb, reducen sus niveles de Twist y se diferencian en CFs. Cada CF presenta un patrón específico de expresión génica que va a determinar las

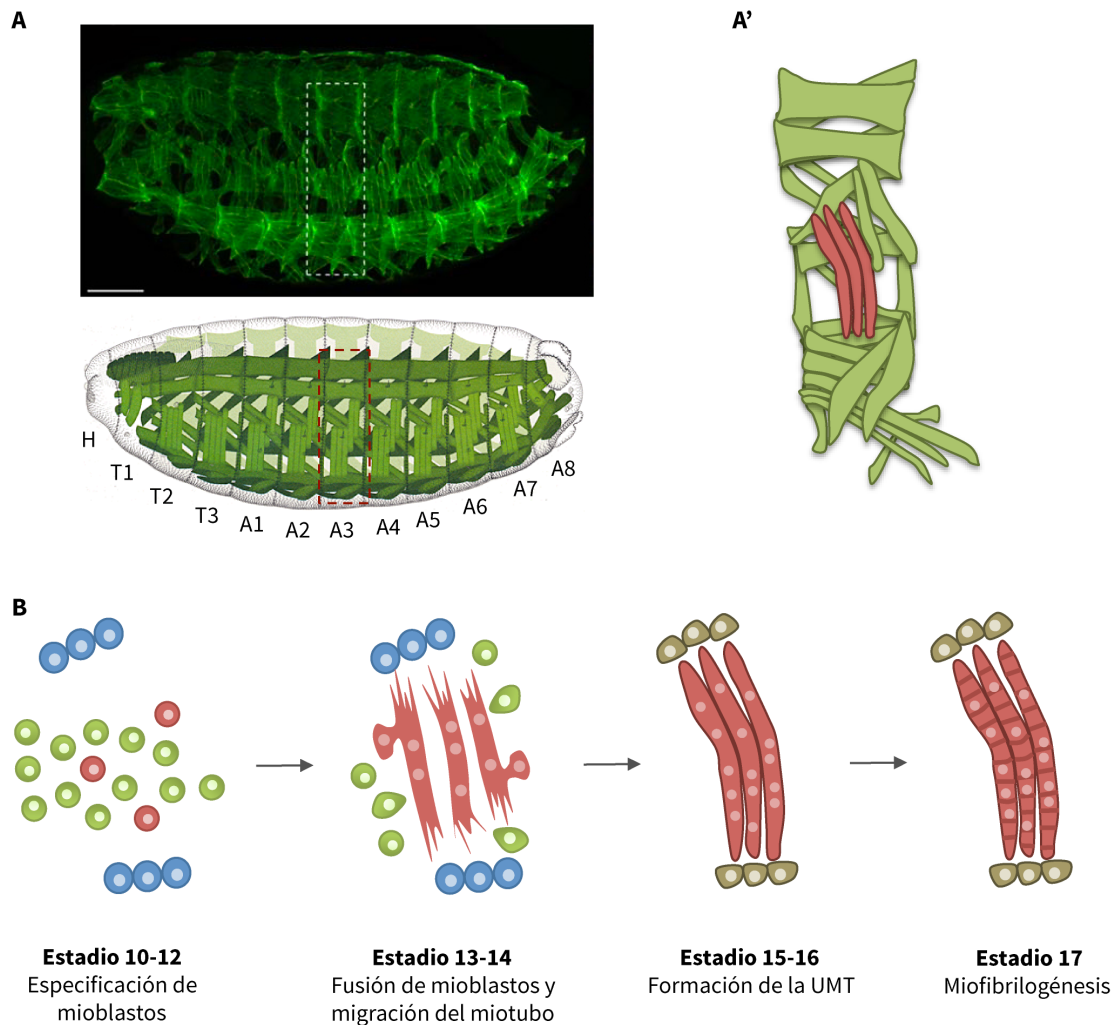


Figura 6

Desarrollo de la musculatura embrionaria somática de *Drosophila*. (A) En la parte superior se observa una micrografía confocal de la musculatura somática donde se marca en verde la Tropomiosina (Schejter and Baylies, 2010). Embrión de estadio 16. Barra de escala=50 μ m. La parte inferior muestra un esquema de esta musculatura (Hartenstein, 1993). H: cabeza; T1-T3: segmentos torácicos; A1-A8: segmentos abdominales. (A') Patrón muscular encontrado en cada uno de los hemisegmentos A2-A7, que corresponde a las regiones delimitadas por línea punteada en A. (B) Correspondencia entre los estadios del desarrollo embrionario y los principales eventos de la miogénesis somática. Se muestra el desarrollo de tres músculos representados en rojo en A'. Identificación de las células unicelulares representadas: MCFs (verde); CFs (rojo); precursores del tendón (azul); células del tendón (marrón).

características del músculo en desarrollo, existiendo tantas CFs como músculos diferentes. Algunos ejemplos de genes de identidad de las células fundadoras son *even skipped*, *ladybird*, *nautilus*, *krüppel*, o *apterous* (Baylies et al., 1998; Tixier et al., 2010).

Principalmente, durante los estadios 13 y 14 tienen lugar los eventos de fusión entre mioblastos, que conducen a la formación del músculo sincitial o multinucleado (Bate, 1990) (Fig. 6). En este proceso de fusión cada CF atrae y se une a varios MCFs, incrementando el tamaño del músculo en formación mediante la fusión de nuevos MCFs (Bate, 1990). El hecho de que los MCFs se unan a las CFs y no entre sí, viene dado por los receptores de membrana que presentan. Todas las CFs presentan Dumbfounded (Duf), que atrae a los MCFs (Ruiz-Gómez et al., 2000) y se une a sus proteínas transmembrana Sticks y Stones (Abmayr and Pavlath, 2012). Las CFs determinan el patrón muscular, pudiendo llegar a formar músculos completamente diferenciados aún en ausencia de eventos de fusión, como ocurre en líneas mutantes del gen *myoblast city*, una proteína activada por Duf que regula la reorganización del citoesqueleto durante el proceso de fusión (Abmayr and Pavlath, 2012; Rushton et al., 1995).

De manera simultánea a la fusión entre mioblastos, el miotubo en formación va migrando hacia las células precursoras del tendón, con las que establece contacto en el estadio 15. El desarrollo de la UMT comprende desde este momento hasta el estadio 16 (Bate, 1990; Weitkunat and Schnorrer, 2014) (Fig. 6). El proceso de migración del músculo está mediado por moléculas segregadas por los precursores del tendón. Aunque no se ha identificado ningún mecanismo general que regule la migración de todos los músculos embrionarios de *Drosophila*, se han encontrado algunas moléculas esenciales en este proceso para grupos específicos de músculos. En este sentido, se ha identificado el ligando Slit, que es reconocido por el receptor transmembrana Roundabout, presente en los músculos ventrolongitudinales (Kramer et al., 2001). El receptor muscular Echinoid también es requerido para el proceso de guía de los músculos ventrolongitudinales y transversales-laterales (Swan et al., 2006). Además, el receptor tirosina quinasa Derailed es requerido en los músculos transversales-laterales para el reconocimiento de sus sitios de unión (Callahan et al., 1996), habiéndose identificado recientemente a Wnt5 como posible ligando de Derailed durante este proceso (Lahaye et al., 2012).

Por otra parte, también se ha observado que la proteína muscular transmembrana Perdido es requerida para el proceso de guía hacia el tendón de algunos músculos embrionarios, así como para iniciar la formación de la UMT (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007), aunque hasta el momento no se ha identificado ningún ligando extracelular para esta proteína. El inicio de la UMT, induce la diferenciación final de las células precursoras del tendón. Este proceso es mediado por la liberación desde el músculo del ligando Vein, que activa una ruta de señalización en el tendón vía EGF-R (Yarnitzky et al., 1997). Tras su diferenciación, las células del tendón acumulan en su membrana la proteína Lrt, que interacciona con el receptor Roundabout de la membrana del músculo y detiene la migración del músculo (Wayburn and Volk, 2009). A continuación, ambas células secretan componentes de la MEC, como Laminina y Thrombospondin en el caso del tendón, y Tigrin el músculo (Schweitzer et al., 2010). En la membrana de ambas células se ensamblan heterodímeros de integrina (α PS1 β PS en el tendón y α PS2 β PS en el músculo). La integrina α PS1 β PS interacciona con laminina (Gotwals et al., 1994), mientras que la integrina α PS2 β PS se une a Thrombospondin (Chanana et al., 2007; Subramanian et al., 2007) y Tigrin (Bunch et al., 1998). Este anclaje de las integrinas a la MEC permite resistir la tensión producida durante la contracción muscular (Brown, 2000).

Finalmente, en el estadio 17 tiene lugar la diferenciación a miofibra (Weitkunat and Schnorrer, 2014) (Fig. 6), produciéndose el ensamblaje de las proteínas sarcoméricas en miofibrillas (apartado miofibrillogénesis). Esta diferenciación permite al embrión eclosionar y comenzar el estadio larvario.

• **Desarrollo de la musculatura somática adulta de *Drosophila***

Mientras que la musculatura somática del embrión/larva de *Drosophila* es muy homogénea, la musculatura somática adulta está compuesta por músculos muy diferentes en tamaño, morfología e incluso fisiología. El desarrollo de los músculos del tórax y el abdomen ha sido bien caracterizado (Dutta and VijayRaghavan, 2006). La musculatura torácica adulta está compuesta por dos grupos de músculos, todos ellos multifibrilares: los

directos del vuelo (que controlan el movimiento del ala) y los indirectos del vuelo (que producen cambios de posición en el ala mediante deformación de la cutícula) (Fig. 7A). Los músculos indirectos del vuelo se activan mediante estiramiento de manera no sincronizada.

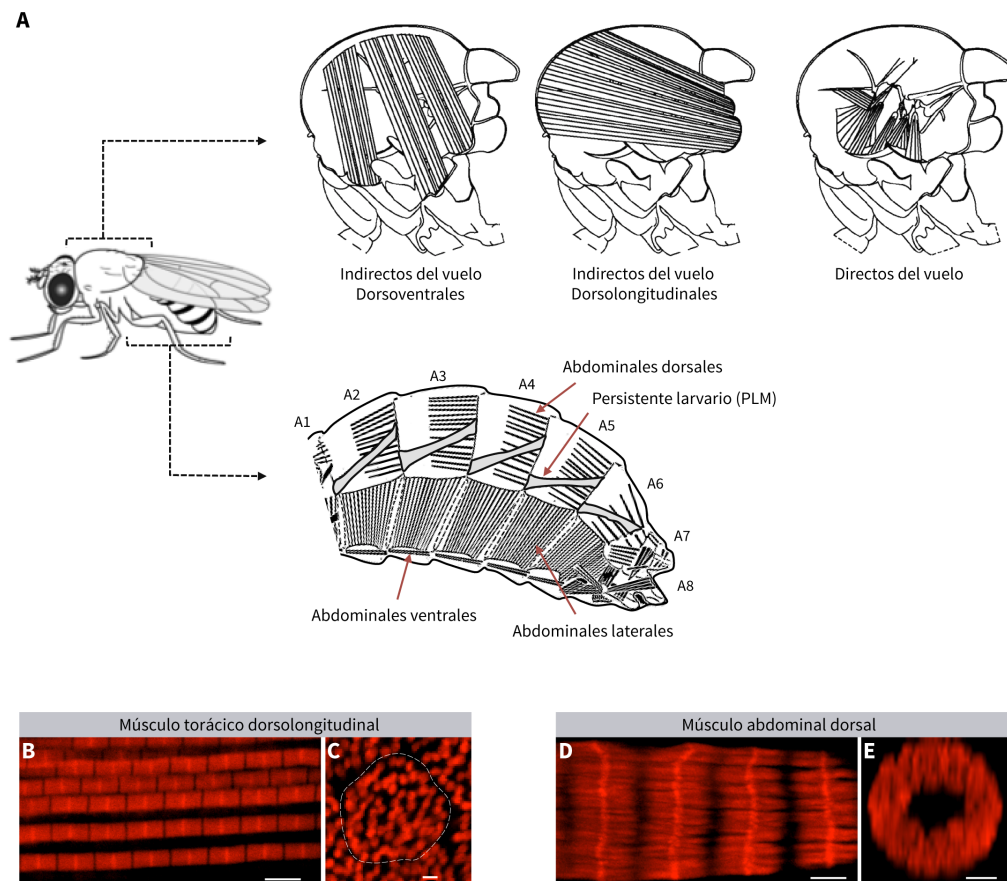


Figura 7

Musculatura somática adulta de *Drosophila*. (A) Representación de los diferentes grupos de músculos encontrados en la región torácica y abdominal (Dickinson, 2005; Miller, 1950). (B-E) Micrografías confocales de las miofibrillas de los músculos torácicos dorsolongitudinales (B y C) y de los músculos abdominales dorsales (D y E). En rojo se visualiza la actina. Barras de escala=3 μ m. (B y D) Vistas longitudinales de los músculos. (C y E) Vistas transversales de los músculos. Nótese que en los músculos torácicos dorsolongitudinales las miofibrillas no están alineadas entre sí (B) y ocupan todo el espacio sarcoplasmático (C), mientras que en los músculos abdominales dorsales, las miofibrillas aparecen alineadas y organizadas de manera tubular (D), quedando un espacio libre de miofibrillas en el centro de la fibra muscular (E). El área punteada en C delimita una única fibra muscular.

Esto se debe a su organización tipo fibrilar, en la que las miofibrillas no están alineadas entre sí (Schönbauer et al., 2011) (Fig. 7B y C). Dentro de los músculos indirectos del vuelo se puede diferenciar entre los dorsoventrales y los dorsolongitudinales (Fig. 7A). Por otro lado, la musculatura adulta abdominal, requerida principalmente para la copulación y la oviposición, se clasifica en tres grupos: los músculos ventrales, los laterales y los dorsales (Fig. 7A). Todos ellos son unifibrilares y tubulares (Fig. 7D y E).

En *Drosophila*, una vez finalizado el desarrollo embrionario se produce la eclosión de la forma larvaria. La larva eclosionada, considerada de estadio uno, crece mediante dos procesos de muda, alcanzando finalmente el estadio tres. Posteriormente, estas larvas inician la fase de pupa, durante la cual la mayor parte de los tejidos larvarios son destruidos mediante muerte celular programada, mientras que simultáneamente se van desarrollando los nuevos tejidos que formaran el adulto o imago. El desarrollo de los órganos del adulto tiene lugar desde células precursoras adultas de diferentes linajes presentes en la larva, mientras que la estructura cuticular se forma a partir de unas estructuras indiferenciadas denominadas discos imaginales. Concretamente, la musculatura somática se forma a partir de los precursores de la musculatura adulta, especificados en el mesodermo somático durante el desarrollo embrionario (apartado anterior), y que permanecen en estado quiescente hasta la metamorfosis, comenzando a proliferar en las etapas finales del periodo larvario. De este modo, al final de la fase larvaria se pueden distinguir varias poblaciones de precursores de la musculatura adulta. Aquellos que originan la musculatura adulta del tórax y de las patas se asocian a los discos imaginales de ala y de pata respectivamente, mientras que los precursores que originan la musculatura adulta abdominal se asocian a los nervios segmentarios e intersegmentarios de la larva (Atreya and Fernandes, 2008; Broadie and Bate, 1991; Dutta et al., 2004).

El desarrollo de la musculatura dorsal del abdomen representa un claro ejemplo de miogénesis adulta bien caracterizado (Fig. 8). Cada hemisegmento abdominal del embrión presenta un patrón de 6 precursores de la musculatura adulta, en el que se diferencian tres células localizadas dorsalmente, dos lateralmente y una ventralmente, que darán lugar a los músculos dorsales, laterales y ventrales abdominales respectivamente. Todos estos mioblastos están asociados a un nervio específico. Durante el periodo larvario estas células

se dividen, observándose 6 grupos de células en cada hemisegmento abdominal del tercer estadio larvario. Todas estas células expresan el factor de transcripción Twist y el gen *duf* (Dutta et al., 2004), que codifica una proteína característica de las CFs embrionarias que permite la atracción y fusión con los MCFs (apartado anterior). Durante las primeras 24 horas de la fase de pupa (APF, del inglés “after puparium formation”) la musculatura larvaria se histoliza, al igual que las ramificaciones nerviosas que la inervan. No obstante, el nervio principal de cada hemisegmento permanece (Currie and Bate, 1991). En este mismo periodo, en el caso de la musculatura dorsal, los mioblastos adultos continúan proliferando a medida que migran a lo largo de este nervio principal en dirección a la línea media dorsal. Aproximadamente a las 20h APF tiene lugar la especificación de las CFs adultas y un poco más tarde (≈ 25 h APF) comienza el proceso de fusión entre mioblastos. Durante el proceso de especificación algunos mioblastos dejan de expresar *twist* e incrementan los niveles de expresión de *duf*, mientras que el resto de mioblastos dejan de expresar *duf* y mantienen sus niveles de Twist. Este proceso de segregación de mioblastos no parece depender de inhibición lateral mediada por Notch, como ocurre en el embrión (apartado anterior). No obstante, estas células con altos niveles de Duf actúan como CFs, atrayendo al resto de mioblastos y formando células multinucleadas. Además, al igual que ocurre en el embrión, cada CF adulta forma una fibra muscular, estableciéndose el patrón muscular aún en ausencia de fusión (Dutta et al., 2004). Se ha observado, que la especificación de las CFs adultas abdominales es mediada por Heartless, un receptor de FGFs (Dutta et al., 2005). Una vez que los mioblastos se van fusionando con las CFs, también dejan de expresar *twist*.

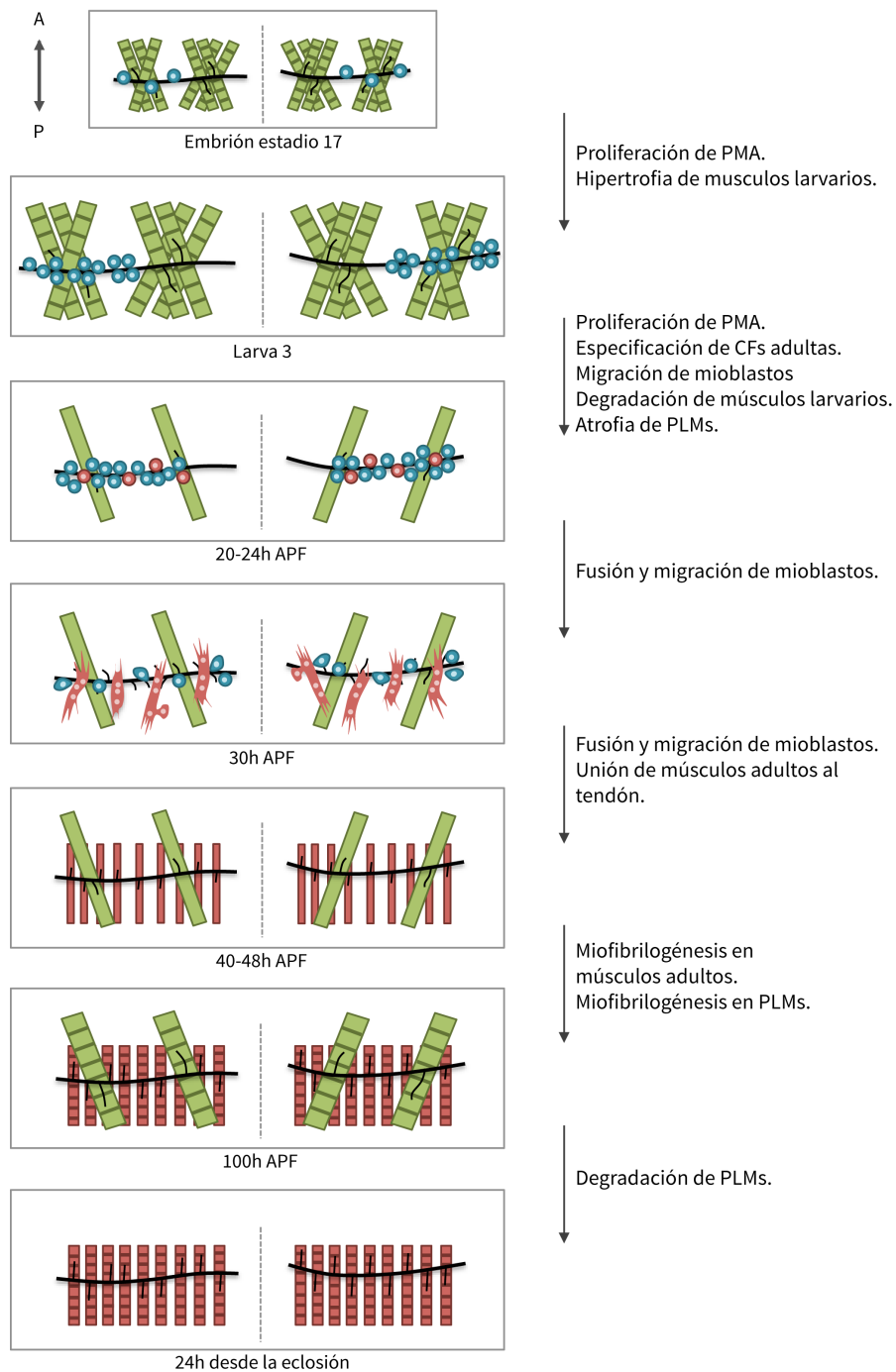
Los miotubos en formación comienzan a elongarse, orientándose en el eje antero-posterior del animal, al tiempo que se generan en el mismo eje numerosas proyecciones del axón. Esta etapa ha sido estudiada únicamente a nivel celular, desconociéndose la maquinaria molecular responsable (Currie and Bate, 1991). Pasadas las 40h APF el patrón está establecido y los músculos aparecen unidos por ambos extremos a las células del tendón, quedando segregados entre sí y distribuidos a lo largo de la región dorsal del hemisegmento (entre 17 y 22 músculos en los segmentos A2-A7). En este momento del desarrollo, se observa como solo han permanecido y se han desarrollado aquellas proyecciones del axón que inervan músculos. Desde las 48h APF en adelante los músculos se

diferencian a miofibra mediante el ensamblaje de miofibrillas (Currie and Bate, 1991; Dutta et al., 2004; Weitkunat and Schnorrer, 2014).

Por una lado, la innervación parece servir de soporte y guía durante el proceso de migración de estos músculos (Currie and Bate, 1991), pero además se ha observado que la denervación de la región dorsal del abdomen produce defectos en la proliferación de los mioblastos y el crecimiento de los músculos (Currie and Bate, 1995). Aunque este requerimiento también ha sido detectado durante el desarrollo de la musculatura torácica (Fernandes and Keshishian, 1998), permanecen por ser aclarados los mecanismos por los que la innervación regula la miogénesis de estos músculos.

Paralelamente a la formación de una nueva musculatura somática desde los precursores de la musculatura adulta, casi toda la musculatura larvaria se histoliza durante la fase de pupa. No obstante, existen algunos músculos larvarios que permanecen y pasan a formar parte de la musculatura del adulto. Así sucede en el caso de la musculatura abdominal, donde en la parte dorsal de cada hemisegmento hay 2 ó 3 músculos larvarios que escapan a la degradación durante el desarrollo pupal (Fig. 8). Estos músculos persistentes larvarios (PLMs, del inglés “persistent larval muscles”) sufren una remodelación estructural durante la pupación (Ribeiro et al., 2011; Wasser et al., 2007) y se requieren para la eclosión de la pupa, aunque son histolizados pasadas 24h desde la eclosión (Truman, W. Kimura, 1990) (Fig. 8).

Por otra parte, en el desarrollo de los MDL del tórax, los precursores de la musculatura adulta se fusionan a un grupo de músculos larvarios oblicuos que no son degradados (Fernandes et al., 1991). En este caso, estos músculos larvarios no solo pasan a formar parte de la musculatura adulta, sino que además establecen el patrón de los MDL (Roy and VijayRaghavan, 1998), desempeñando un papel similar al de las CFs en la formación del resto de músculos somáticos de *Drosophila*. De hecho, estos músculos larvarios también presentan altos niveles de Duf (Dutta et al., 2004).

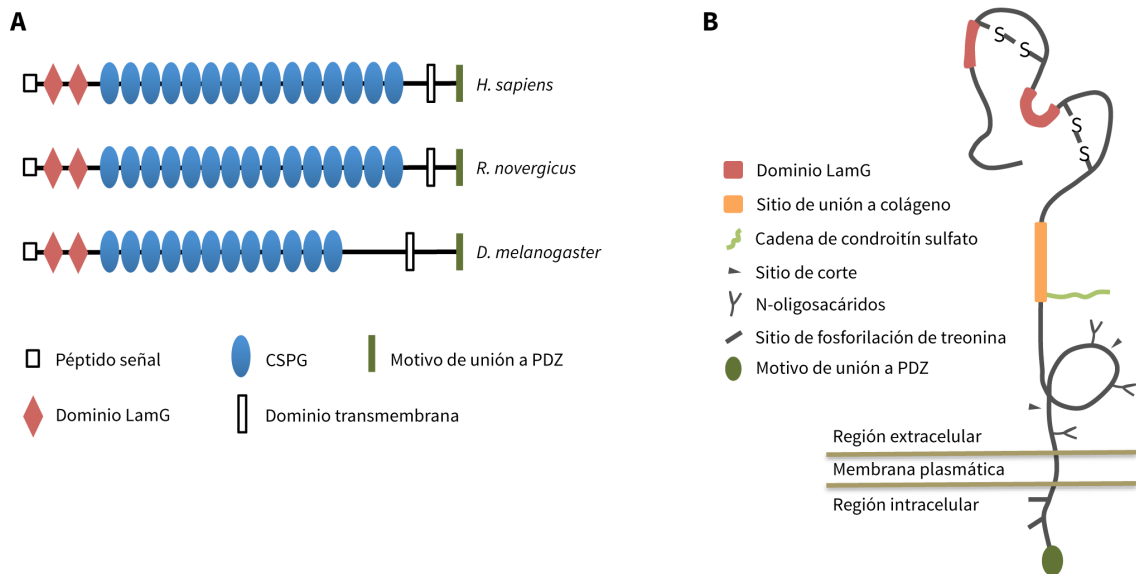
**Figura 8**

Desarrollo de la musculatura adulta dorsal del abdomen de *Drosophila*. Representación de la musculatura de la región dorsal abdominal de un único segmento a lo largo del desarrollo. Para simplificar el esquema solo se muestran los núcleos de los mioblastos, y las células del tendón no se representan. Músculos embrionarios/larvarios en verde. Músculos adultos en rojo. PLMs (músculos larvarios persistentes). PMA (precursores de la musculatura adulta; En azul). CFs (células fundadoras; En rojo). Las líneas negras representan el nervio y sus ramificaciones. La línea gris punteada representa la línea media dorsal. A: anterior; P: posterior.

El escaso conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la miogénesis, en especial de los procesos de unión del músculo al tendón, así como de la regulación de la diferenciación final de la célula muscular, implica un especial interés en la identificación de genes involucrados en tales procesos. En este sentido, es especialmente relevante el estudio detallado de la función de estos genes en sistemas modelo como son la musculatura embrionaria y adulta de *Drosophila*.

El gen perdido/Kon-tiki

Recientemente, los laboratorios de A.M. Michelson y de F. Schnorrer identificaron de manera independiente la implicación de un nuevo gen (*perdido*, *perd*) en el desarrollo de la musculatura embrionaria somática de *Drosophila*. De acuerdo a su secuencia, *perd* codifica una proteína transmembrana de unos 2300 aminoácidos denominada Perdido (Perd) (Estrada et al., 2007) o Kon-tiki (Kon) (Schnorrer et al., 2007). La parte extracelular, presenta un péptido señal en el extremo amino, dos dominios laminina-G y múltiples repeticiones CSPG (del inglés “chondroitin sulfate proteoglycan”). La pequeña región intracelular (≈ 150 aminoácidos) presenta un motivo de unión a PDZ en el extremo carboxilo de la proteína. Estos dominios están conservados en los ortólogos de mamíferos NG2 (rata) y CSPG4 (humanos) (Schnorrer et al., 2007; Staub et al., 2002) (Fig. 9A). NG2 y CSPG4 presentan en su región extracelular varios sitios de corte proteolítico cerca del dominio transmembrana, y sufren modificaciones postraduccionales como N-glicosilación y adición de cadenas de condroitín sulfato (Trotter et al., 2010) (Fig. 9B). No obstante, la adición de condroitín sulfato no se ha detectado en Perd (Schnorrer et al., 2007). En base a la nomenclatura usada en los estudios de mamíferos, y al habitual empleo combinado de células tanto de origen humano como de rata o ratón, en adelante se denominará NG2 al ortólogo de Perd en mamíferos, independientemente de la especie en cuestión.

**Figura 9**

Estructura de la proteína transmembrana Perd/NG2/CSPG4. (A) Representación de los dominios de la proteína codificada en las distintas especies. CSPG: abreviación de chodroitin sulfate proteoglycan repeat. Los dominios están representados aproximadamente a escala dentro de la secuencia (Staub et al., 2002). (B) Representación esquemática del modelo de la estructura de NG2 (*Rattus novergicus*) (Stallcup and Huang, 2008).

• Perd en el desarrollo de la musculatura embrionaria de *Drosophila*

Los trabajos de Estrada y Schnorrer (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007) muestran que el gen *perd* regula las proyecciones de algunos miotubos embrionarios de *Drosophila* y su posterior unión a las células del tendón, controlando así el reconocimiento y la adhesión entre músculos y tendones. Perd aparece principalmente localizado en los extremos de los músculos, en las regiones que lideran la migración hacia los precursores del tendón (Schnorrer et al., 2007). En concreto, los músculos ventrolongitudinales (VL) son los que presentan un mayor requerimiento de *perd* (Fig. 10A). En condiciones silvestres, los músculos VL1 presentan una morfología elongada y rectangular, quedando unidos a las células del tendón en la región de los bordes del segmento (Fig. 10A y B). Por el contrario, en embriones mutantes para *perd*, los músculos VL1 presentan una morfología redondeada e irregular (Fig. 10B). Estos músculos muestran una superficie de unión a las células del tendón claramente inferior que en condiciones silvestres, y en algunos casos ni siquiera

llegan a establecer dicha unión, formando miosferas (flecha en Fig. 10B). Además, a diferencia de los músculos silvestres, que producen filopodios hacia su lugar de anclaje, la falta de función de *perd* conlleva la aparición de filopodios en direcciones anómalas (cabeza de flecha en Fig. 10B) (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007).

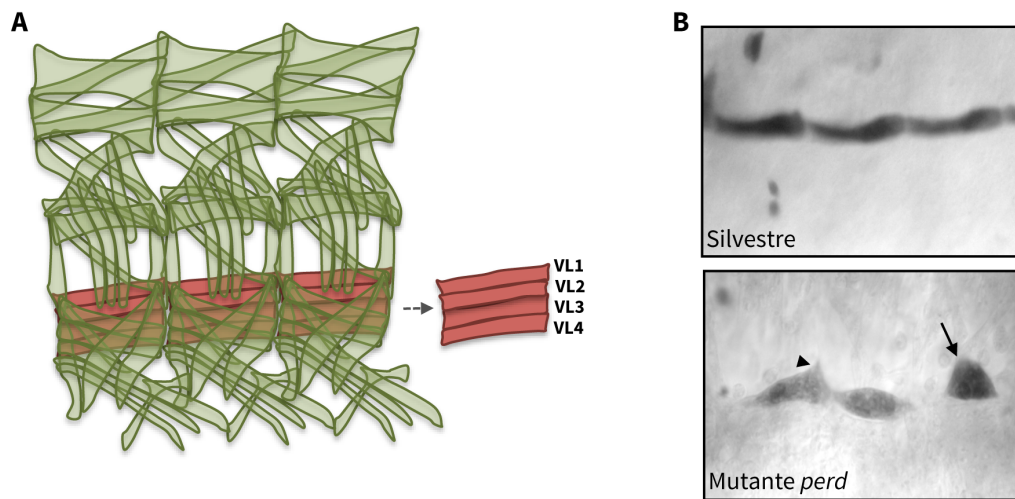


Figura 10

Función de *Perd* en la miogénesis de la musculatura somática embrionaria de *Drosophila*. (A) Representación de la musculatura embrionaria somática de tres segmentos embrionarios de *Drosophila*. Los músculos ventrolongitudinales (VL) aparecen resaltados en rojo. Se indican los diferentes músculos VL encontrados en cada segmento: VL1-4. (B) Micrografías de tres segmentos embrionarios donde se ha marcado únicamente el músculo VL1 (Estrada et al., 2007). Nótese que en los embriones mutantes de *perd*, los músculos forman miosferas (flecha) y producen filopodios en direcciones incorrectas (cabeza de flecha).

• NG2 en el músculo esquelético de mamíferos

Mediante el empleo de cultivos celulares miogénicos de ratón y humanos, se ha observado que NG2 se expresa tanto en los mioblastos tardíos (post-mitóticos) como en losmiotubos. En la etapa postnatal, además de localizarse en la vasculatura que irriga el músculo esquelético adulto, NG2 se localiza también en el sarcolema de las miofibras esqueléticas de humanos durante los primeros años de vida, así como en la membrana

postsináptica de la unión neuromuscular. Con la edad, los niveles de NG2 en el sarcolema van descendiendo progresivamente, excepto en aquellas fibras que sufren regeneración, en las que los niveles de NG2 se incrementan específicamente (Petrini et al., 2003). En este mismo estudio se observa también como los niveles de NG2 en el sarcolema disminuyen en condiciones de distrofia muscular congénita por déficit de merosina, mientras que se incrementan en pacientes con distrofia muscular de Duchenne. Además, dos trabajos independientes han mostrado un descenso significativo de los niveles de NG2 en el sarcolema del músculo esquelético de pacientes con distrofia muscular de Ulrich (Higashi et al., 2006; Petrini et al., 2005).

Durante la vida adulta, la regeneración y crecimiento del músculo esquelético es mediada principalmente por las células satélite. Sin embargo, se ha observado que otros tipos celulares encontrados en el músculo esquelético, o en otras partes del organismo como es el caso de la medula ósea, pueden actuar también como progenitores de células musculares (Chargé and Rudnicki, 2004). En este sentido, se ha demostrado que los pericitos encontrados en los vasos sanguíneos que irrigan el músculo esquelético postnatal de humanos, pueden diferenciarse *in vitro* en células musculares y regenerar *in vivo* la musculatura en ratones (Dellavalle et al., 2007). Aunque NG2 no se expresa en las células satélite, es uno de los principales marcadores de los pericitos de la musculatura esquelética (Birbrair et al., 2014).

• Mecanismos moleculares de Perd/NG2

En *Drosophila*, el único ligando de Perd que ha sido identificado es la proteína multi-PDZ GRIP (del inglés “glutamate receptor interacting protein”) (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Las proteínas PDZ están involucradas en la formación de complejos proteicos que unen proteínas transmembrana a rutas de señalización intracelular, regulando múltiples procesos biológicos como la proliferación o la polaridad celular (Lee and Zheng, 2010; Ranganathan and Ross, 1997). La falta de función de GRIP en la miogénesis de la musculatura embrionaria produce fenotipos similares a los observados en los mutantes de

perd (filopodios mal orientados y miosferas). *Perd*, a través de su motivo de unión a PDZ, interacciona directamente con el séptimo dominio PDZ de GRIP, reclutándolo en los extremos del miotubo en migración. Aunque estos datos sugieren que *Perd* lleva a cabo su función a través de GRIP, el hecho de que la expresividad de los defectos mencionados en la miogénesis embrionaria sea significativamente menor en los mutantes de GRIP que en los mutantes de *Perd*, indica que *Perd* presenta funciones adicionales independientes de GRIP (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Experimentos adicionales muestran la existencia de interacción genética de *perd* e integrinas en los procesos de guía del músculo hacia el tendón y en la formación de la UMT (Estrada et al., 2007).

En mamíferos, NG2 ha sido ampliamente estudiado y relacionado con el desarrollo y la homeostasis del sistema nervioso central (Nishiyama et al., 2009; Trotter et al., 2010), donde forma un complejo con GRIP y el receptor de glutamato AMPA, habiéndose observado la interacción directa entre NG2 y GRIP (Stegmüller et al., 2003). Por tanto, la unión entre *Perd* y GRIP (Estrada et al., 2007) está conservada evolutivamente. Además de GRIP, otros ligandos que interaccionan con el dominio de unión a PDZ son MUPP1 (Barritt et al., 2000) y Sintenina (Chatterjee et al., 2008). Se ha propuesto que estas proteínas podrían conectar NG2 con elementos estructurales y de señalización del citoplasma. De hecho, NG2 se requiere para la migración de las células NG2 (Karram et al., 2005), mediando la reorganización del citoesqueleto de actina vía p130cas y las rhoGTPasas Rac y Cdc42 (Eisenmann et al., 1999; Majumdar et al., 2003). También se ha observado que la fosforilación de ciertos residuos de treonina de la región citoplasmática de NG2 (Fig. 9B) por ERK y α PKC, determina la inducción de proliferación o migración celular (Makgiansar et al., 2007). Por otro lado, se ha identificado la interacción de la parte extracelular de NG2 con factores de crecimiento (Goretzki et al., 1999), metaloproteinasas de la MEC (Iida et al., 2001), plasminógeno y angiotastinas (Goretzki et al., 2000), colágeno V y VI (Tillet et al., 1997) (Fig. 12B) y Galectin-3 (Wen et al., 2006).

A pesar de las interacciones directas que se han descrito entre NG2 y proteínas relacionadas con complejos de señalización intracelular, múltiples estudios indican que NG2 regula la reorganización del citoesqueleto y la movilidad celular a través de rutas de señalización dependientes de integrinas (Karram et al., 2005). En el caso de la Integrina β 1,

se ha observado que interacciona en *cis* con NG2, induciendo la proliferación y migración de células de melanoma (Iida et al., 1992; Iida et al., 1995). Por otra parte, en los vasos sanguíneos en desarrollo NG2 localiza en la membrana de los pericitos, interaccionando en *trans* con el complejo Galectin-3/Integrina $\alpha 3\beta 1$ de la membrana de las células epiteliales, promoviendo la movilidad de estas células y la angiogénesis (Fukushi et al., 2004). No obstante, también se ha demostrado que la unión entre NG2 y Colágeno VI activa la migración celular mediante la reorganización del citoesqueleto de actina vía independiente de Integrinas (Tillet et al., 2002). Considerando esta interacción y los descensos de NG2 observados en pacientes con distrofia muscular de Ulrich, asociada a mutaciones en genes codificantes de colágeno VI (Higashi et al., 2006) y en la que las integrinas no se ven afectadas, se ha propuesto que NG2 podría ser un receptor esencial para unir la MEC con el sarcolema (Petrini et al., 2005).

En base a la información actual sobre Perd y sus ortólogos de mamíferos, el estudio detallado de la función de Perd durante la miogénesis de *Drosophila* permitirá comprender mejor la biología del músculo, lo que podría implicar un mayor conocimiento de las patologías musculares humanas. Además, este estudio también es de especial interés para descifrar los mecanismos moleculares responsables de las interacciones entre la MEC y los receptores de adhesión celular.

Objetivos

El estudio del desarrollo muscular o miogénesis es crucial para comprender mejor no solo la biología del músculo, sino también los mecanismos responsables de las miopatías. Los estudios realizados en diferentes organismos muestran que el desarrollo muscular es un proceso conservado evolutivamente. En este sentido, el organismo modelo *Drosophila melanogaster* ha mostrado ser un excelente sistema para el estudio de las bases moleculares y celulares de la miogénesis (Taylor, 2006).

Trabajos previos han mostrado que durante el desarrollo de la musculatura embrionaria de *Drosophila*, el proteoglicano transmembrana Perdido (Perd), ortólogo del receptor de mamíferos NG2, se requiere para la unión del músculo al tendón (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Por un lado, se desconoce si la función de Perd es específica de la musculatura embrionaria o si está conservada en otros tipos musculares. Además, no se ha analizado su participación en las últimas etapas de la diferenciación muscular. Por ello, con la finalidad de estudiar en mayor detalle la función de Perd en la musculatura, en esta tesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudio de la función de Perd durante las diferentes etapas de la miogénesis adulta.
- Análisis de la función de Perd en el mantenimiento de la musculatura.
- Estudio de los mecanismos moleculares responsables de la función de Perd en la musculatura.

Resultados

1. Perd en la miogénesis adulta

Durante el desarrollo de la musculatura embrionaria de *Drosophila*, *Perd* tiene un papel fundamental tanto en el proceso de guía del músculo hacia el tendón, como en la formación de una unión estable entre ambos tipos celulares. Sin embargo, estas funciones no parecen estar conservadas en toda la musculatura, observándose que *Perd* se requiere sólo para el desarrollo de algunos de los distintos músculos que componen cada segmento embrionario (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). La musculatura adulta de *Drosophila* se desarrolla de manera similar a la musculatura del embrión. Así, durante la miogénesis adulta, los mioblastos sufren un proceso de especificación y fusión, donde el miotubo resultante migra hacia las células del tendón con las que se une de manera estable. La musculatura adulta provee un excelente modelo para analizar no sólo los primeros estadios de la miogénesis, sino también las últimas fases de la diferenciación muscular. En este trabajo se decidió analizar la función de *Perd* durante la miogénesis de la musculatura adulta. En concreto, nuestro estudio se centró en la musculatura dorsal del abdomen. El desarrollo de estos músculos ha sido previamente caracterizado (Currie and Bate, 1991; Dutta et al., 2004; Krzemien et al., 2011; Ribeiro et al., 2011), proporcionando un modelo de estudio bien definido. Además, esta musculatura presenta un patrón relativamente simple y está localizada justo bajo la epidermis, por lo que resulta ser un buen sistema para el análisis microscópico *in vivo*.

1.1. *Perd* se requiere para el desarrollo de la musculatura adulta

Debido a que la falta de función de *Perd* provoca letalidad embrionaria, para estudiar su función durante el desarrollo de la musculatura adulta se decidió reducir los niveles de *Perd* usando el sistema UAS/GAL4 (Brand and Perrimon, 1993). Para ello se emplearon dos *UAS-ARNi*, las construcciones *JF01159* y *106680*, dirigidas respectivamente contra el quinto y el último exón del ARNm de *perd* (Fig. 11). La expresión de estos ARNis se indujo mediante el empleo de dos líneas GAL4: la línea *mef2-GAL4*, que se expresa en todos los mioblastos y

RESULTADOS

músculos durante todo el desarrollo (Bryantsev et al., 2012; Ranganayakulu et al., 1996) y la línea *1151-GAL4*, que se expresa en los mioblastos precursores de los músculos adultos y en los miotubos en desarrollo (Anant et al., 1998; Sudarsan et al., 2001). La expresión de los ARNis se controló mediante una construcción termosensible de GAL80 (Pfeiffer et al., 2010), represor de la proteína GAL4. Esto permitió reducir los niveles de *Perd* de manera específica en diferentes momentos del desarrollo. Así, se expresaron los ARNis específicamente desde el inicio del desarrollo del adulto (estadio pupal). La expresión de *perd* ARNi 106680 con cualquiera de las líneas GAL4 descritas, resultó en pupas incapaces de eclosionar, sugiriendo que la reducción de los niveles de *Perd* durante el desarrollo pupal conlleva defectos en la función muscular.

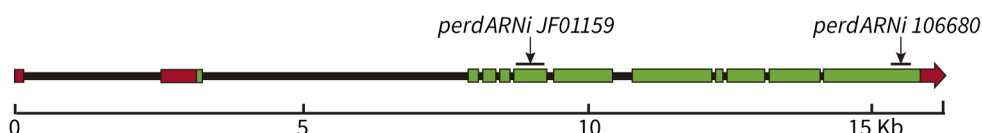
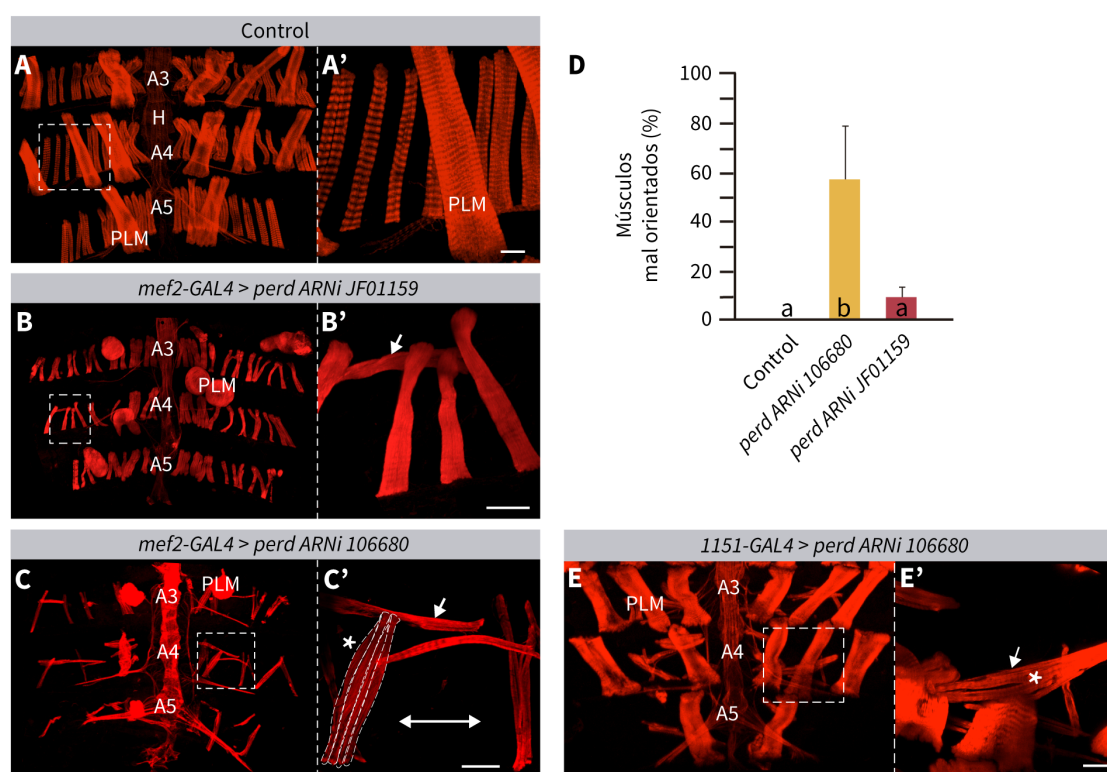


Figura 11

Representación esquemática de la región genómica de *perd*. Se indican las secuencias reconocidas por los ARNis contra *perd* empleados en este trabajo. Las líneas negras representan los intrones, las secuencias UTR están representadas en rojo y los exones en verde. Kb: kilobases.

Se analizó la musculatura dorsal del abdomen mediante el marcaje de la actina y visualización con microscopía confocal. Al final del desarrollo pupal (80-100h APF) en la situación control, los músculos dorsales adultos quedan distribuidos homogéneamente a lo largo de los hemisegmentos, así como orientados paralelos al eje antero-posterior del animal (Fig. 12A y A'). Orientados en la misma dirección que los músculos adultos pero de mayor tamaño, se encuentran los músculos larvarios que no son histolizados durante el desarrollo de la pupa, los PLMs (Currie and Bate, 1991) (Fig. 12A). La expresión de los distintos ARNi contra *perd* bajo el control de *mef2-GAL4*, produjo la aparición de fibras adultas mal orientadas (Fig. 12B y C), llegando a detectarse casos de fibras completamente perpendiculares respecto a la orientación observada en el control (flecha en Fig. 12B' y C'). En estos abdómenes se observó además, que los PLMs formaron miosferas (Fig. 12B y C), en lugar de aparecer extendidos como en el control (Fig. 12A). El fenotipo observado en la

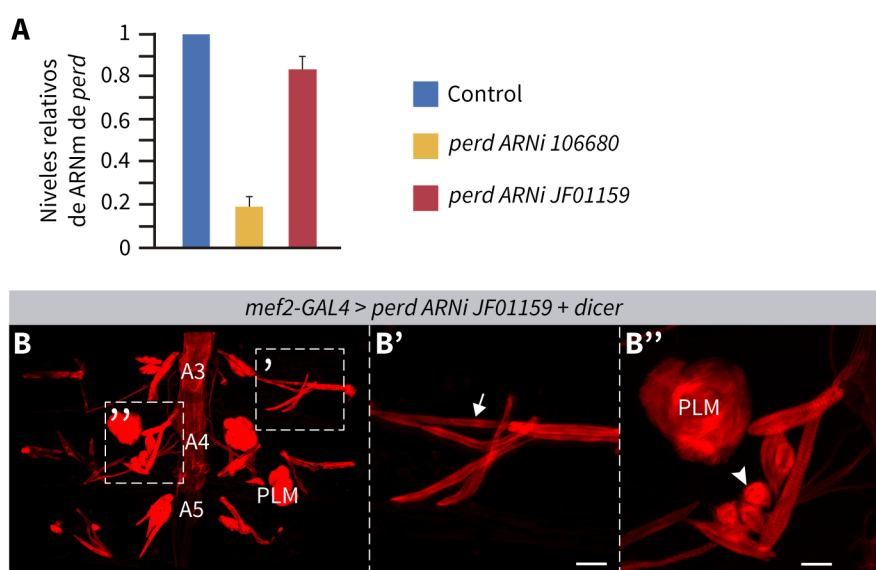
**Figura 12**

La expresión de *perd* ARNi causa defectos en el desarrollo de la musculatura adulta. (A-C', E y E') Micrografías confocales de la musculatura dorsal del abdomen al final del desarrollo pupal visualizada con Rodamina-Faloidina, que marca la actina (rojo). (A, A') A las 80-100h APF, la musculatura del control aparece orientada paralela al eje antero-posterior y distribuida homogéneamente a lo largo del segmento abdominal. (B-C') La expresión de los diferentes ARNis resulta en músculos abdominales adultos mal orientados (flechas) y PLMs (músculos persistentes larvarios) formando miosferas. (C, C') Además, la expresión del ARNi 106680 causa defectos en la distribución de la músculos, apareciendo regiones del segmento carentes de musculatura (flecha doble) y agrupaciones de fibras (asterisco). Estos músculos son más delgados que en el control. A3, A4 y A5 indican los segmentos abdominales correspondientes. H: corazón. Barras de escala=20 μ m. (D) Porcentaje de músculos mal orientados por hemisegmento (n=9). Las barras etiquetadas con letras diferentes indican grupos estadísticamente significativos. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SD). (E, E') Cuando la expresión del ARNi 106680 es dirigida por la construcción 1151-GAL4 se reproduce el fenotipo observado en la musculatura adulta al usar *mef2*-GAL4. El asterisco señala un agrupamiento de fibras. Genotipos: Control (*tub*-GAL80ts/+ ; *mef2*-GAL4/+), *mef2*-GAL4 > *perd* ARNi JF01159 (*tub*-GAL80ts/+ ; *mef2*-GAL4/UAS-*perd* ARNi JF01159), *mef2*-GAL4 > *perd* ARNi 106680 (*tub*-GAL80ts/UAS-*perd* ARNi 106680 ; *mef2*-GAL4/+), 1151-GAL4 > *perd* ARNi 106680 (1151-GAL4/+ ; UAS-*perd* ARNi 106680/+).

RESULTADOS

distribución de la musculatura adulta resultó ser claramente más frecuente cuando se expresó el *ARNi 106680* (un 56,4 % de fibras mal orientadas frente a un 10 % cuando se expresó el *ARNi JF01159*) (Fig. 12D). Se consideraron como mal orientados aquellos músculos que presentaban al final del desarrollo pupal (80-100h APF) un ángulo igual o mayor a 45° C respecto al eje antero-posterior del animal. Aunque con el *ARNi JF01159* no se apreciaron defectos adicionales a los ya descritos, la expresión de la construcción *106680* produjo también la aparición de fibras agrupadas (asterisco en Fig. 12C'), siendo además estas fibras más delgadas que en la situación control. Todos estos fenotipos observados en la musculatura adulta, se reprodujeron al expresar el *ARNi 106680* bajo el control de *1151-GAL4* (Fig. 12E y E'). En este último caso, como era esperable por el patrón de expresión de la construcción *1151-GAL4*, específico de la musculatura adulta, los PLMs no mostraron diferencias respecto al control (Fig. 12E). Los defectos en la orientación y distribución de las fibras sugieren que *Perd* se requiere para establecer el patrón muscular adulto. Por otra parte, el fenotipo observado en el tamaño de las fibras en los abdómenes con niveles reducidos de *Perd* indica que o bien el crecimiento de la fibra no sucede correctamente, o que tiene lugar una degeneración de la misma. Finalmente, la aparición de los PLMs como miosferas en estos mismos abdómenes, sugiere defectos en la unión miotendinosa.

Como se ha mostrado, la expresión de *perd ARNi 106680* produjo defectos en la miogénesis adulta que no se observaron al expresar la línea *JF01159*, como la aparición de fibras agrupadas y de menor grosor que en el control. Además, aunque con ambos *ARNi* se encontraron músculos orientados de manera errónea, este fenotipo fue más frecuente al expresar la línea *106680* (Fig. 12D). Para comprobar que las diferencias observadas al expresar ambos *ARNi* eran debidas a la eficiencia de cada construcción, se llevó a cabo una cuantificación relativa de los niveles de *ARNm* de *perd* mediante PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos mostraron que la línea *106680* redujo estos niveles en un 80,4 % respecto al control, mientras que la línea *JF01159* fue menos eficiente, mostrando una reducción del 17 % respecto al control (Fig. 13A). Estos resultados están en concordancia con la penetrancia de los fenotipos observados en ambos casos.

**Figura 13**

Los ARNis empleados funcionan específicamente contra el ARNm de *perd*. (A) La expresión de ambas líneas ARNi produce una reducción de los niveles de ARNm de *perd*, siendo más eficiente la construcción 106680 (n=2). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SD). (B-B'') Micrografías confocales de la musculatura dorsal del abdomen al final del desarrollo pupal (80-100h APF) visualizada con Rodamina-Faloidina, que marca la actina (rojo). La coexpresión de *dicer* y el ARNi JF01159 reproduce el fenotipo observado con el ARNi 106680 (ver Fig. 12). La flecha en B' indica una fibra mal orientada. El incremento de la eficiencia del ARNi permite observar la aparición de miosferas adultas (cabeza de flecha en B''). A3, A4 y A5 indican los segmentos abdominales correspondientes. PLM: músculo persistente larvario. Barras de escala=20 μ m. Genotipo: A (sección Material y Métodos), B (*UAS-dicer/+ ; mef2-GAL4/UAS-perd ARNi JF01159*).

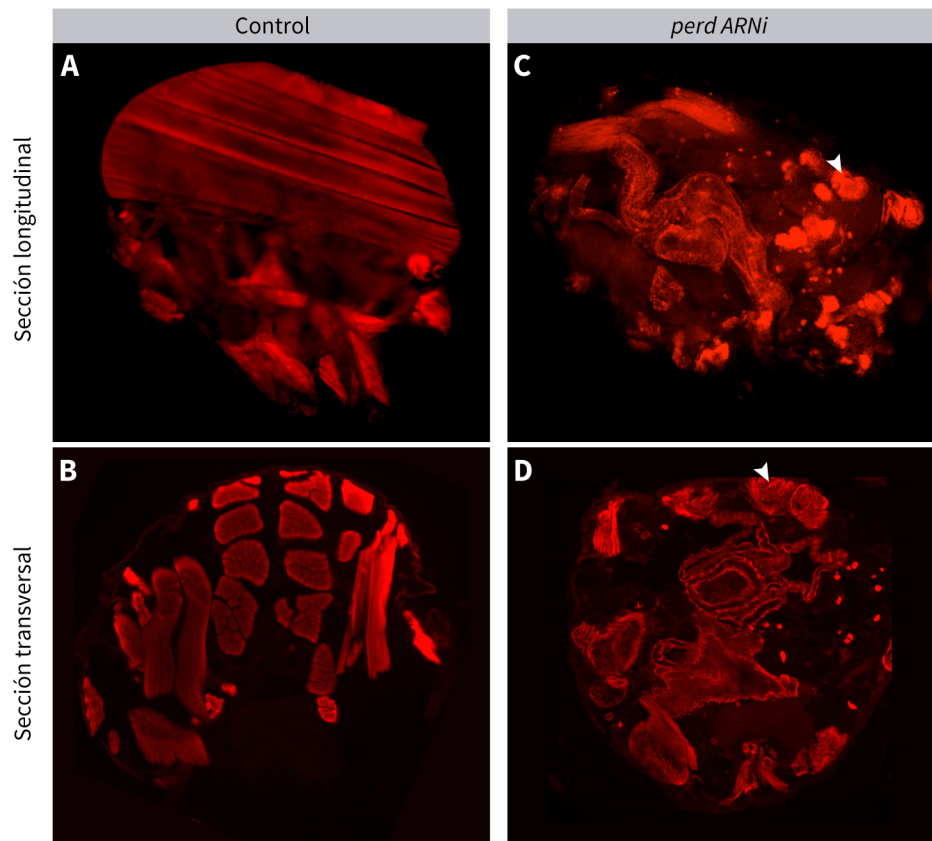
Si bien se observó que la expresión del ARNi 106680 reducía los niveles de ARNm de *perd* en mayor medida que la línea JF01159, para verificar que los fenotipos adicionales encontrados en la miogénesis adulta al usar la línea 106680 se debían únicamente a su eficiencia y no a defectos provocados por otras posibles dianas al ARNm de *perd*, se decidió incrementar la eficiencia de la línea JF01159. Para ello, esta línea fue expresada junto con una copia del gen *dicer*. Dicer es un componente de la maquinaria molecular de la interferencia de ARNm, e incrementando sus niveles se potencia la eficiencia de los ARNi (Dietzl et al., 2007). De este modo, se observó que la sobreexpresión de *dicer* junto al ARNi JF01159 reprodujo el fenotipo producido por la línea 106680, apreciándose un aumento en la cantidad de fibras mal orientadas respecto a cuando se expresó solamente el ARNi JF01159, así como fibras agrupadas y con un grosor inferior al de las fibras del control (Fig. 13B y B'). Además, se observó que algunas de estas fibras formaban miosferas (Fig. 13B''), indicando

RESULTADOS

que al igual que ocurre en parte de la musculatura embrionaria (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007) y en los PLMs (Fig. 12B y C), *Perd* es requerido para la unión miotendinosa en los músculos adultos.

Con el objetivo de analizar si la función de *Perd* en miogénesis está conservada en otros tipos de musculatura, se analizaron también los músculos indirectos del vuelo, encontrados en la región torácica. Esta musculatura es de tipo fibrilar, a diferencia de los músculos del abdomen, que son tubulares (Fernandes et al., 1991). La expresión del *ARNi 106680* bajo el control de *mef2-GAL4* durante todo el desarrollo pupal, produjo la formación de miosferas en la musculatura del tórax (Fig. 14C y D). Este resultado sugiere que el papel de *Perd* en la unión miotendinosa está conservado tanto en músculos de tipo tubular como de tipo fibrilar. Conjuntamente con las observaciones realizadas en la musculatura abdominal, estos datos indican que *Perd* se requiere de manera específica para el correcto desarrollo de la musculatura adulta, manteniendo su función embrionaria en los procesos de guía hacia el tendón y de formación de la unión miotendinosa.

Debido a que la línea *mef2-GAL4* se expresa a lo largo de todo el desarrollo de la musculatura adulta, permitiendo expresar los ARNs desde cualquier etapa de la miogénesis, se decidió utilizar esta línea *GAL4* para llevar a cabo una caracterización más detallada de la función de *Perd* durante el desarrollo de la musculatura dorsal del abdomen. Conjuntamente, para continuar este trabajo, se decidió emplear la línea *ARNi 106680*, la cual mostró una alta eficiencia reduciendo los niveles de ARNm de *perd*. Además, cuando se expresó la línea *106680* bajo el control de *mef2-GAL4* durante todo el desarrollo pupal, los músculos adultos del abdomen se mantuvieron unidos al tendón, lo que proporciona un buen sistema para estudiar las últimas etapas de la diferenciación del músculo en condiciones de bajos niveles de *Perd*. Por tanto, salvo que se indique lo contrario, en adelante la expresión de *perd* *ARNi* o la reducción de los niveles de *Perd* se referirá a la expresión de la construcción *106680* mediante *mef2-GAL4*.

**Figura 14**

La expresión de *perd* ARNi produce defectos en el desarrollo de la musculatura del vuelo. Micrografías confocales de cortes longitudinales (A, C) y transversales (B, D) del tórax al final del desarrollo pupal (80-100h APF). La musculatura es visualizada con Rodamina-Faloidina, que marca la actina (rojo). (A, B) En la situación control, los músculos aparecen organizados en paquetes y quedan distribuidos a lo largo de toda la región torácica. (C, D) La expresión de *perd* ARNi produce la desorganización general de la musculatura, observándose frecuentemente la presencia de miosferas (cabeza de flecha). Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), *perd* ARNi (*tub-GAL80ts/UAS-perd* ARNi 106680 ; *mef2-GAL4/+*).

1.2. *Perd* se requiere para la migración y segregación de los miotubos adultos

La expresión de *perd* ARNi produjo defectos en la distribución y orientación de los músculos abdominales (Fig. 12C y C'). Con el objetivo de estudiar más detalladamente este

RESULTADOS

fenotipo, se llevó a cabo un análisis *in vivo* del desarrollo de esta musculatura en individuos control e individuos que expresaban *perd ARNi*. Para visualizar los músculos a largo del desarrollo pupal se dirigió la expresión de *UAS-mCD8::GFP* con *mef2-GAL4*. Este análisis fue realizado por nuestro colaborador el Dr. Marcus Bischoff, de la Universidad de Cambridge. En la situación control, pasadas las 10h APF se observaron mioblastos empezando a migrar desde las partes laterales del abdomen hacia la región central. Aproximadamente entre las 20 y las 26h APF, mientras la migración ocurre, se observaron los primeros eventos de fusión

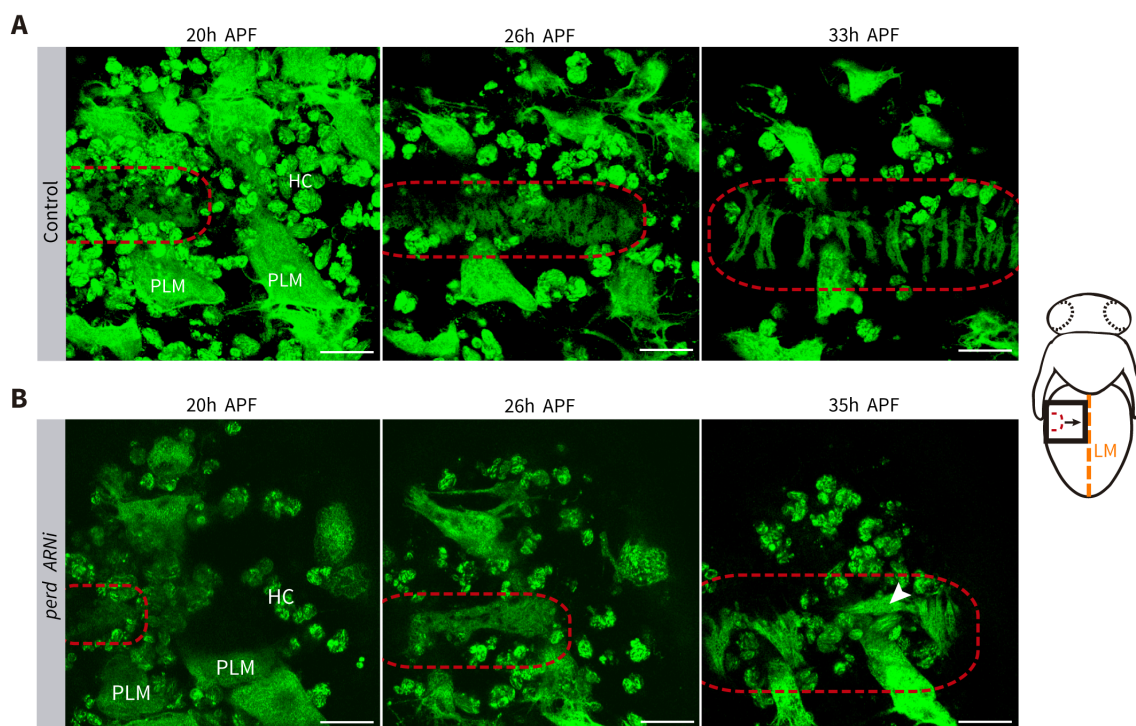


Figura 15

Análisis *in vivo* de la miogénesis de la musculatura adulta dorsal del abdomen expresando *perd ARNi*. Los músculos adultos, larvarios y hemocitos se visualizan con *mCD8::GFP* mediante microscopia confocal. El esquema a la derecha del panel indica la localización de las imágenes así como la dirección de la migración de las células musculares adultas. LM: línea media. (A) En el control, aproximadamente entre las 20 y las 35h APF los mioblastos adultos migran y se fusionan. Los miotubos resultantes se orientan en el eje antero-posterior y se segregan a lo largo del hemisegmento. (B) Cuando se expresa *perd ARNi*, los miotubos no se segregan ni distribuyen homogéneamente a lo largo del hemisegmento. Además, algunos miotubos permanecen durante todo el desarrollo perpendiculares al eje antero-posterior (cabeza de flecha). La línea punteada roja indica la localización de los mioblastos/miotubos adultos en desarrollo. PLM: músculo persistente larvario. HC: hemocitos. Barras de escala=50 μ m. Genotipos: Control (*mef2-GAL4/UAS-mCD8-GFP*), *perd ARNi* (*UAS-perd RNAi 106680/+ ; mef2-GAL4/UAS-mCD8-GFP*).

de mioblastos, pudiendo llegar a identificarse miotubos individuales. Estos miotubos se fueron distribuyendo a lo largo del hemisegmento y alineando en el eje antero-posterior. Aproximadamente a las 30h APF, la mayoría de los músculos estaban segregados y orientados correctamente (Bate et al., 1991) (Fig. 15A). El análisis *in vivo* de la miogénesis en abdómenes que expresaban *perd ARNi*, mostró que pasadas las 20h APF algunos músculos fallaron al orientarse en el eje antero-posterior, manteniendo una orientación errónea hasta el final del desarrollo. Además, los músculos no se segregaron correctamente unos de otros, formando agrupaciones (Fig. 15B). El hecho de encontrar algunos músculos bien orientados y parcialmente segregados, puede deberse a que el ARNi no redujo por completo los niveles de *Perd* (Fig. 12D), o bien a la existencia de otros genes cuya función sea redundante a la de *Perd* en la regulación del proceso de guía. No obstante, pudieron observarse casos donde la expresión de *perd ARNi* produjo que todos los músculos del hemisegmento quedaran perpendiculares al eje antero-posterior y formando una única agrupación. Esto sugiere que *Perd* podría ser no solo requerido, sino esencial para el proceso de guía hacia el tendón en estos músculos.

1.3. La reducción de los niveles de *Perd* no afecta a la especificación de las células fundadoras ni a la fusión de los mioblastos

En este trabajo, se ha mostrado como los abdómenes de aquellos animales que expresaban *perd ARNi* presentaron regiones carentes de músculos (Fig. 12C y C'). Aunque los defectos observados en la segregación y distribución de esta musculatura podrían explicar este fenotipo, también podría deberse a que la reducción de los niveles de *Perd* afectase al número de músculos. En *Drosophila*, el número de músculos, tanto en embrión como en el adulto, está determinado por el número de células fundadoras (Atreya and Fernandes, 2008; Bate, 1990; Dutta et al., 2004). De este modo, defectos en la especificación de estas células produce una reducción del número de músculos al final del desarrollo. Para conocer si la especificación de los mioblastos fundadores estaba o no afectada al reducir los niveles de *Perd*, se cuantificó el número de músculos adultos dorsales del abdomen al final del desarrollo pupal. Este análisis no reveló diferencias significativas en el número de fibras,

RESULTADOS

encontrándose una media de 16,4 fibras musculares por hemisegmento en los animales control, y de 16,1 en animales que expresaban *perd ARNi* (Fig. 16A). Estos datos no mostraron diferencias significativas, indicando que al igual que ocurre en el embrión (Estrada et al., 2006; Estrada et al., 2007), el proceso de especificación de las células fundadoras adultas, y por consiguiente el número de fibras, no se ve afectado al reducir los

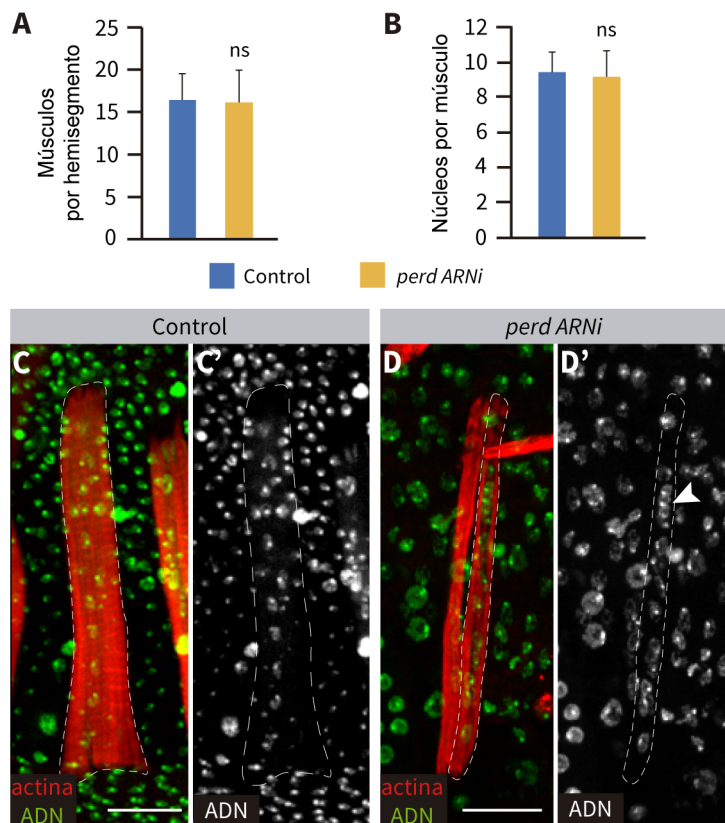


Figura 16

La reducción de los niveles de *Perd* no afecta al número de músculos ni al número de núcleos por célula.

Cuantificación a las 80-100h APF del número de músculos adultos dorsales en cada hemisegmento abdominal (n=9) (A) y del número de núcleos en cada uno de estos músculos (n=9) (B). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SD). ns: no significativo. (C, D) La actina de los músculos dorsales adultos del abdomen es visualizada con Alexa 488-Faloidina, y el ADN con TO-PRO 3. Aparecen teñidos núcleos no musculares, localizados fuera del lumen muscular. (D) Se muestran dos fibras musculares, pero solo una (delineada por línea punteada) está completa y muestra todos sus núcleos. (C) En los músculos control, los núcleos aparecen distribuidos homogéneamente a lo largo de la longitud de la fibra. Esta distribución está afectada cuando se expresa *perd ARNi* (cabeza de flecha en D'). Barras de escala=20 μ m. Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), *perd ARNi* (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi 106680 ; mef2-GAL4/+*).

niveles de *Perd*. Por tanto, la aparente falta de músculos que se observó en estos abdómenes se debe principalmente a los defectos encontrados en la orientación y la segregación de las fibras, las cuales quedan agrupadas en unas pocas regiones del hemisegmento.

Además de no quedar distribuidos homogéneamente, se observó que al final del desarrollo pupal los músculos con bajos niveles de *Perd* eran más delgados que en la situación control (Fig. 12A' y C'; Fig. 16 C y D). Este fenotipo puede deberse a diferentes causas. El primer evento durante la miogénesis que influye en el tamaño del músculo en desarrollo es la fusión de los mioblastos, lo que implica que a mayor número de mioblastos fusionados mayor será el tamaño del músculo formado (Bate, 1990). Con el fin de analizar si el proceso de fusión estaba o no afectado al reducir los niveles de *Perd*, se decidió cuantificar el número de núcleos por miofibra al final del desarrollo en las diferentes condiciones experimentales. Dicho análisis no reveló diferencias significativas en el número de núcleos, encontrándose una media de 9,5 núcleos por músculo en el control y de 9,3 al reducir los niveles de *Perd* (Fig. 16B-D'). Estos datos indican que la fusión entre mioblastos ocurre correctamente a bajos niveles de *Perd*. Sin embargo, debe destacarse que mientras que en el control los núcleos estaban distribuidos homogéneamente a lo largo de la fibra, la expresión de *perd* *ARNi* causó la aparición de núcleos agrupados (cabeza de flecha en Fig. 16D'). Estos defectos observados en la distribución de los núcleos podrían indicar fallos en la organización del citoesqueleto.

1.4. *Perd* se requiere para la miofibrillogénesis

Tras la fusión de los mioblastos, el miotubo resultante se une a las células del tendón por ambos extremos y comienza el proceso de diferenciación a miofibra. Esta diferenciación está marcada por la formación de miofibrillas, estructuras contráctiles cuya unidad básica funcional es el sarcómero. El ensamblaje de estas estructuras, conocido como miofibrillogénesis, conlleva no solo la diferenciación funcional del músculo, sino también un crecimiento del tamaño de la célula (Piccirillo et al., 2014; Sanger et al., 2009). En base a

RESULTADOS

esto, y considerando que aquellos músculos que expresaban *perd ARNi* presentaron menor grosor que los músculos control (Fig. 12A' y C'), el siguiente paso fue estudiar si este fenotipo era debido a defectos en la miofibrillogénesis.

La visualización de las miofibrillas se llevó a cabo mediante el marcaje de los filamentos de actina, los cuales pueden detectarse desde las primeras etapas de la miofibrillogénesis (Sparrow and Schöck, 2009). De este modo, se analizó el ancho de la musculatura dorsal del abdomen en dos momentos específicos del desarrollo, a las 50h APF, una vez que los músculos se han unido a las células del tendón y ha comenzado la miofibrillogénesis (Weitkunat and Schnorrer, 2014), y a las 100h APF, una vez completado el desarrollo. La cuantificación del ancho se realizó en la región central del músculo. A las 50h APF, los músculos control presentaron un ancho medio de 7,8 μm (Fig. 17A y E), observándose el lumen completamente recubierto de miofibrillas (Fig. 17A'). Al final del desarrollo (100h APF) estos músculos mostraron un notable incremento de su grosor, alcanzando una media de 12,8 μm (Fig. 17B y E). La cantidad de miofibrillas observada fue claramente mayor que a las 50h APF (Fig. 17B'), indicando que tras establecerse el patrón definitivo de la musculatura estos músculos crecen vía miofibrillogénesis. Sin embargo, al reducir los niveles de *Perd* se observó que a las 50h APF los músculos eran ya significativamente más delgados que en el control, con un ancho medio de 5,5 μm (Fig. 17C y E). Además, estos músculos mostraron amplias regiones alrededor del lumen carentes de miofibrillas (Fig. 17C'), indicando defectos desde los primeros estadios de la miofibrillogénesis. Una vez alcanzado el final del desarrollo pupal (100h APF) se observó un incremento del ancho del músculo, llegando a 8 μm de media (Fig. 17D y E). No obstante, aunque la periferia de estos músculos con bajos niveles de *Perd* apareció casi totalmente cubierta de miofibrillas (Fig. 17D'), no se apreció un incremento notable de la cantidad de miofibrillas respecto a lo observado a las 50h APF (Fig. 17C' y D'). La comparación a las 100h APF entre el control y aquellos animales que expresaron *perd ARNi* mostró importantes diferencias en el ancho de los músculos (Fig. 17E), así como en la cantidad de miofibrillas (Fig. 17B' y D'), sugiriendo claros defectos en el ensamblaje de las miofibrillas al reducirse los niveles de *Perd*.

Como se ha mostrado, en los músculos tubulares diferenciados pueden distinguirse dos regiones: las miofibrillas, localizadas en la parte periférica del músculo, y el lumen,

encontrado en el centro y que queda rodeado por las miofibrillas (Ribeiro et al., 2011) (asterisco en Fig. 17A'). Aunque la visualización transversal de los músculos reveló una clara diferencia en la cantidad de miofibrillas entre los músculos control y aquellos que

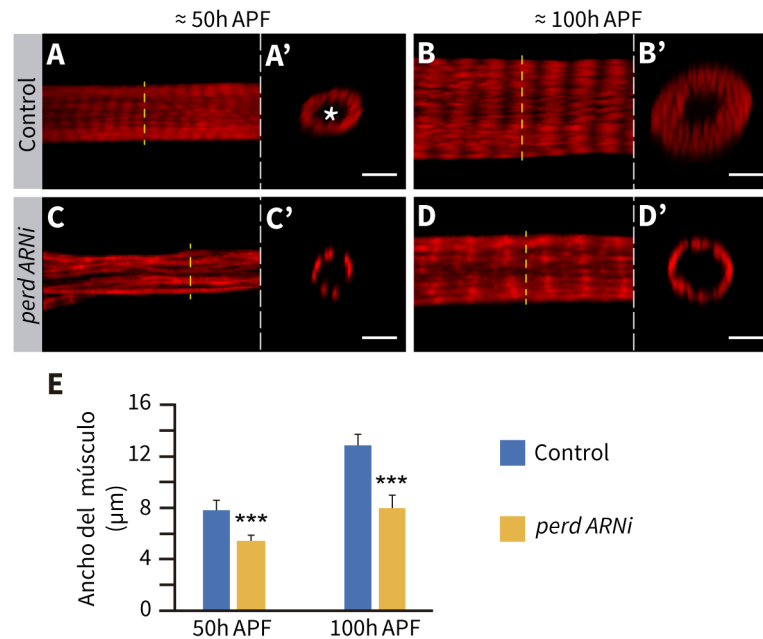


Figura 17

La reducción de los niveles de *Perd* produce una reducción del ensamblaje de miofibrillas. (A-D') Micrografías confocales de músculos adultos dorsales del abdomen. La actina aparece marcada con Rodamina-Faloidina (rojo). A', B', C' y D' muestran secciones ortogonales de los músculos en A, B, C y D respectivamente. El asterisco en A' señala el lumen. (A-B') Entre las 50 y 100h APF, los músculos control presentan un incremento en la cantidad de miofibrillas. (C-D') Los músculos que expresan *perd ARNi* muestran menor cantidad de miofibrillas que los músculos control. Barras de escala=5 μm. (E) Cuantificación del ancho de las fibras musculares a las 50 y 100h APF en la condición control y expresando *perd ARNi* (n=27). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SD). ***P<0,001. Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), *perd ARNi* (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi 106680 ; mef2-GAL4/+*).

expresaron *perd ARNi* (Fig. 17B' y D'), para determinar si la diferencia de anchura observada entre estos músculos (Fig. 17E) se debía específicamente a una menor cantidad de miofibrillas, se cuantificó el tamaño de lumen. Debido a que la morfología del lumen fue variable, se decidió medir su perímetro. En los músculos control el tamaño del lumen se mantuvo constante durante las 50 y 100h APF, con aproximadamente 14 μm de perímetro

RESULTADOS

(Fig. 18A). A las 50h APF, los músculos que expresaban *perd* ARNi mostraron un lumen con perímetro similar al de los músculos control. Sin embargo, estos músculos con niveles reducidos de *Perd* presentaron un crecimiento del lumen al final del desarrollo (100h APF), alcanzando una media de 19,3 μm de perímetro (Fig. 18A). El hecho de que el lumen fuese mayor al reducir los niveles de *Perd*, sugiere que la diferencia observada al comparar el ancho total de estas fibras respecto al de las fibras control (Fig. 17E) se debe únicamente a un defecto en el ensamblaje de las miofibrillas. Además, este incremento del tamaño del lumen indica un cierto crecimiento basal del músculo aún en ausencia de miofibrilogénesis.

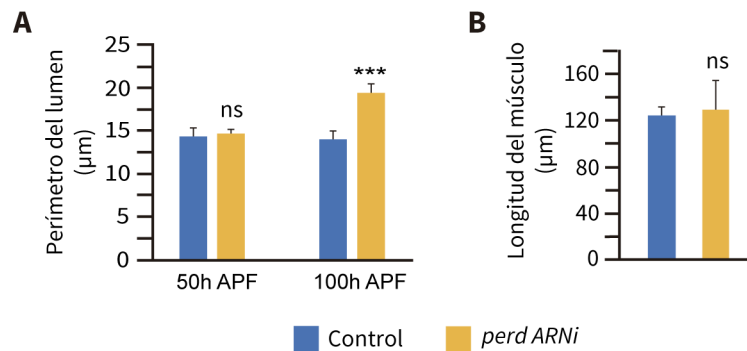


Figura 18

(A, B) Cuantificaciones realizadas en los músculos adultos dorsales del abdomen en la situación control y expresando *perd* ARNi. (A) Cuantificación del perímetro del lumen a las 50 y 100h APF (n=27). Nótese que mientras que en el control el tamaño se mantiene constante, los músculos con niveles reducidos de *Perd* presentan un incremento de las dimensiones del lumen al final del desarrollo. (B) La cuantificación de la longitud de las miofibrillas al final del desarrollo (80-100h APF) no reveló diferencias significativas entre ambos genotipos (n=27). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SD). ns: no significativo. ***P<0,001. Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), *perd* ARNi (*tub-GAL80ts/UAS-perd* ARNi 106680 ; *mef2-GAL4/+*).

Los músculos con niveles reducidos de *Perd* mostraron una menor cantidad de miofibrillas respecto al control (Fig. 17B' y D'), pero además, la mayoría de estos músculos no llegaron a migrar correctamente hacia sus lugares de unión de la epidermis (Fig. 12C'). En el proceso de miogénesis durante la migración del miotubo, los músculos sufren un proceso de elongación hasta alcanzar sus sitios de anclaje (Dutta et al., 2004; Guerin and Kramer, 2009; Schejter and Baylies, 2010), lo que determina la longitud de las miofibrillas formadas. De este modo, los defectos en migración encontrados al reducir los niveles de *Perd*, podrían conllevar el ensamblaje de miofibrillas de mayor longitud que en la situación control,

explicando, al menos parcialmente, porque aparecen menos miofibrillas. Para testar esta posibilidad, se llevó a cabo un análisis de la longitud de los músculos a las 80-100h APF en base a la señal de la actina. Este análisis no reveló diferencias significativas entre el control y la expresión de *perd ARNi* (Fig. 18B), mostrando que Perd se requiere para el ensamblaje de las miofibrillas.

A pesar de que la reducción de los niveles de Perd produjo defectos en la miofibrillogénesis, como se ha mostrado, en tales condiciones llegaron a formarse algunas miofibrillas. El siguiente paso fue comprobar si dichas miofibrillas presentaban una estructura diferenciada, es decir, si estaban organizadas en sarcómeros. Para ello, se estudió la proteína Zasp, localizada de manera específica en las bandas Z de los sarcómeros. La visualización de esta proteína en el control reveló el alineamiento lateral entre los sarcómeros de las distintas miofibrillas, formando una línea continua interrumpida únicamente en la región del lumen, donde no hay presencia de miofibrillas (Fig. 19A). Al reducir los niveles de Perd, Zasp mostró un patrón de bandeo en las pocas miofibrillas que rodeaban el lumen (Fig. 19B), indicando que estas miofibrillas están organizadas en sarcómeros. Sin embargo, a diferencia del control se observó la acumulación de Zasp por todo el sarcoplasma, rodeando los núcleos. Esto sugiere que las proteínas que forman las miofibrillas se acumulan en el citoplasma de manera no organizada, posiblemente debido a que su ensamblaje en sarcómeros es defectuoso. La visualización de la matriz extracelular mediante el uso de anticuerpos contra Perlecan, mostró que tanto en el control como cuando se redujeron los niveles de Perd, las miofibrillas estaban situadas en la parte más externa de la célula (Fig. 19C y D), lo que está en concordancia con la teoría de que las primeras miofibrillas se ensamblan justo debajo del sarcolema (Raeker et al., 2014; Sparrow and Schöck, 2009).

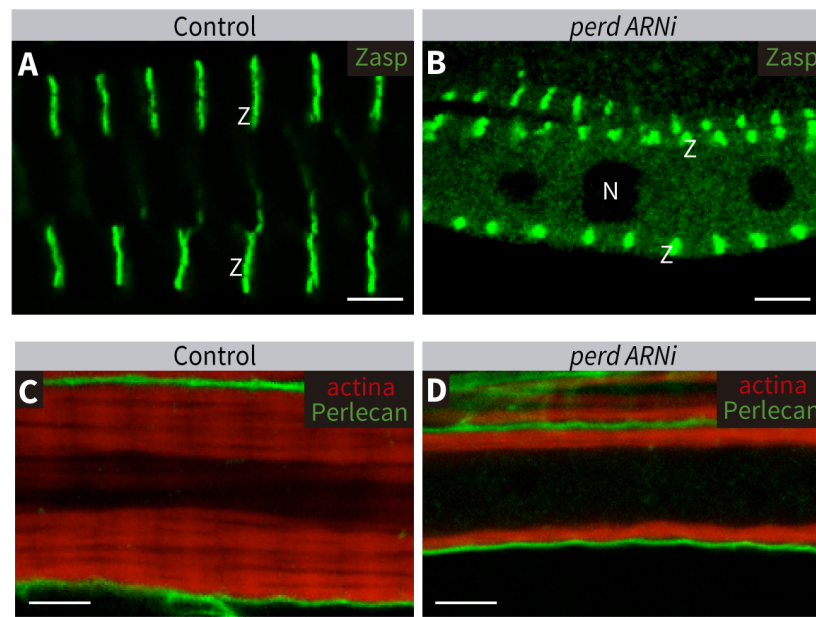


Figura 19

Las miofibrillas formadas a bajos niveles de Perd están organizadas en sarcómeros y se localizan en la periferia del músculo. (A-D) Sección confocal longitudinal de de la región interior de los músculos adultos dorsales del abdomen al final del desarrollo pupal (80-100h APF). (A, B) En verde la proteína sarcomérica Zasp. (A) En la condición control, Zasp aparece formando un patrón de bandas continuas como resultado del alineamiento lateral de las miofibrillas a la altura de las bandas Z (Z). (B) Cuando se expresa *perd* ARNi, Zasp también aparece formando un patrón de bandeo, aunque estas bandas son notablemente más cortas. Además, Zasp aparece acumulado de forma no ensamblada en el espacio citoplasmático del lumen, rodeando los núcleos (N). (C, D) El marcaje de la actina (mediante Rodamina-Faloidina) y del componente de la MEC Perlecan, revela que tanto en la condición control (C) como cuando se expresa *perd* ARNi (D), las miofibrillas ensambladas aparecen en la parte más externa del músculo. Genotipos: A (*UAS-perd* ARNi 106680/+ ; *Zasp::GFP*/+), B (*UAS-perd* ARNi 106680/*tub-GAL80ts* ; *Zasp::GFP/mef2-GAL4*), C (*tub-GAL80ts*/+ ; *mef2-GAL4*/+), D (*tub-GAL80ts/UAS-perd* ARNi 106680 ; *mef2-GAL4*/+). Barras de escala=5 μm.

1.5. La reducción de los niveles de Perd afecta a la organización de la estructura sarcomérica

Los músculos con niveles reducidos de Perd mostraron una baja cantidad de miofibrillas respecto al control, aunque las miofibrillas formadas presentaron una distribución bandeada de la proteína Zasp, lo que sugiere que su estructura era madura y diferenciada

(apartado anterior). Con la finalidad de estudiar en mayor detalle el estado de diferenciación de estas miofibrillas, se decidió analizar diferentes marcadores sarcoméricos al final del desarrollo pupal.

Además de Zasp (Fig. 19A y B), se analizaron dos componentes adicionales de la banda Z sarcomérica, Zormin y Kettin. Estas proteínas son isoformas codificadas por el gen *sallimus* (*sls*), siendo la Titina su ortólogo en vertebrados (Bullard et al., 2005) (Fig. 4). En músculos control, pudo observarse para ambos casos la formación de una línea recta como resultado del correcto alineamiento lateral de las miofibrillas (Fig. 20B y D). Por otro lado, la distribución de estas proteínas en músculos que expresaban *perd ARNi* fue discontinua e irregular (Fig. 20C y E), reflejando defectos en el alineamiento de los sarcómeros. En el caso de Kettin se observó además, que mientras que en el control la señal se extendía desde la banda Z hacía la región central del sarcómero (Bullard et al., 2005) (Fig. 20B), al expresar *perd ARNi* la señal de Kettin quedó restringida exclusivamente a la banda Z (Fig. 20C). Estos resultados están en concordancia con lo observado para el marcador Zasp (Fig. 19A y B), indicando que las bandas Z se forman correctamente en músculos con bajos niveles de Perd. Sin embargo, el defecto observado en la extensión de Kettin sugiere la presencia de fallos estructurales en la región interna del sarcómero.

Con el objetivo de estudiar la organización general del sarcómero, se analizó la miosina, componente mayoritario de los filamentos gruesos. Para ello se emplearon anticuerpos dirigidos contra las cabezas de las cadenas pesadas de la miosina (MHC, del inglés “myosin heavy chain”). En la musculatura control, el patrón de distribución de MHC mostró por un lado falta de señal en la región correspondiente a la banda Z, y además una reducción o ausencia de señal en la parte central del sarcómero, donde hay carencia de cabezas de miosina (Fig. 20A y B). Esta última región, conocida como zona desnuda, no pudo distinguirse en los músculos que expresaban *perd ARNi*, observándose en este caso señal de MHC de manera continua entre las bandas Z (Fig. 20E).

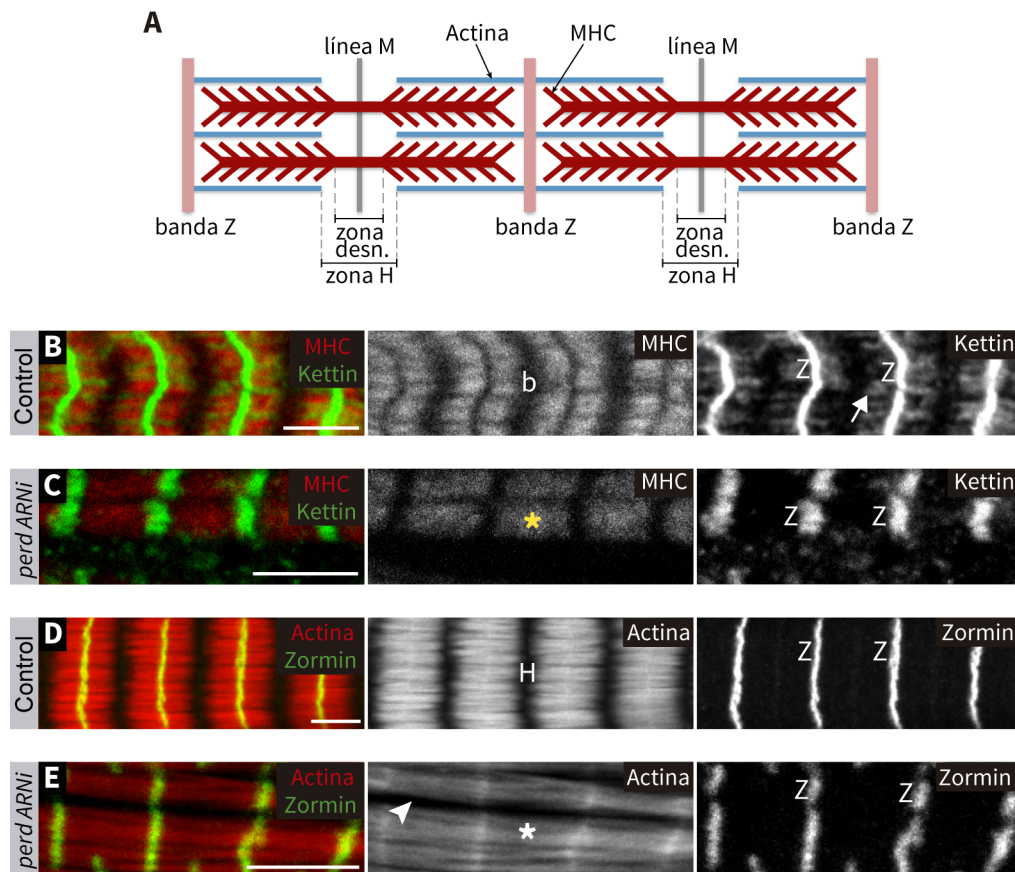


Figura 20

La estructura sarcomérica está afectada en músculos con niveles reducidos de *Perd*. (A) Representación esquemática de la estructura sarcomérica. (B-E) Micrografías confocales de las miofibrillas de los músculos adultos dorsales del abdomen al final del desarrollo (80-100h APF). (B) En músculos control, Kettin se encuentra en las bandas Z y se extiende hacia la parte central del sarcómero (flecha). Las cabezas de las cadenas pesadas de la miosina (MHC) se observan a lo largo de todo el sarcómero a excepción de la banda Z (Z) y la zona desnuda (b). (C) En músculos con niveles reducidos de *Perd*, Kettin aparece restringida a las bandas Z. Además, la visualización de las cabezas de MHC revela la ausencia de la zona desnuda (asterisco amarillo). (D) En los músculos del control la proteína Zormin, encontrada en la banda Z (Z), forma líneas continuas como resultado del alineamiento lateral de las miofibrillas. Mientras que la señal de la actina no es detectada en la región de la zona H (H). (E) Al reducir los niveles de *Perd* el patrón de Zormin aparece discontinuo e irregular. Además, la zona H está reducida o ausente (asterisco). El marcaje de los filamentos de actina también reveló espacios entre las miofibrillas (cabeza de flecha). Para facilitar la visualización de los sarcómeros se muestran planos confocales individuales de las regiones aumentadas. Barras de escala: 5 μ m. Genotipos: A (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/sls::GFP*), B (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi 106680 ; mef2-GAL4/sls::GFP*), C (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), D (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi 106680 ; mef2-GAL4/+*).

Además de la miosina, también se realizó el análisis de la actina, elemento principal de los filamentos delgados. En fibras diferenciadas, la actina se encuentra localizada desde las bandas Z hasta la región central del sarcómero, donde queda un espacio entre los filamentos provenientes de cada lado. Este espacio carente de actina es conocido como zona H (Fig. 20A), y su tamaño varía dependiendo del estado de contracción del sarcómero (Blaustein et al., 2011). En la condición control, el análisis microscópico a alta magnificación de la musculatura abdominal permitió la identificación de la zona H (Fig. 20B), cuyo tamaño, tal y como era de esperar, fue muy variable dependiendo del estado de contracción del músculo. La señal de la actina fue especialmente intensa en la región de las bandas Z (Fig. 20B). Por el contrario, las miofibrillas formadas en músculos con bajos niveles de *Perd* mostraron normalmente una distribución ininterrumpida de la actina a lo largo de toda la longitud del sarcómero (Fig. 20C). En estas condiciones, solo en algunos músculos aislados se llegó a distinguir el espacio entre los filamentos de actina. Estos resultados indican que a bajos niveles de *Perd* las miofibrillas ensambladas presentan una reducción o ausencia de la zona H. Por otra parte, la observación de la actina reveló que mientras que en el control las miofibrillas estaban alineadas lateralmente entre sí, la expresión de *perd ARNi* produjo la presencia de espacios entre las miofibrillas (cabeza de flecha en Fig. 20E), reflejando defectos en el alineamiento y/o unión entre ellas. Estos resultados sugieren que la región del sarcómero contenida entre los discos Z no está formada correctamente, apoyando lo observado en la distribución de Kettin y MHC (ver arriba).

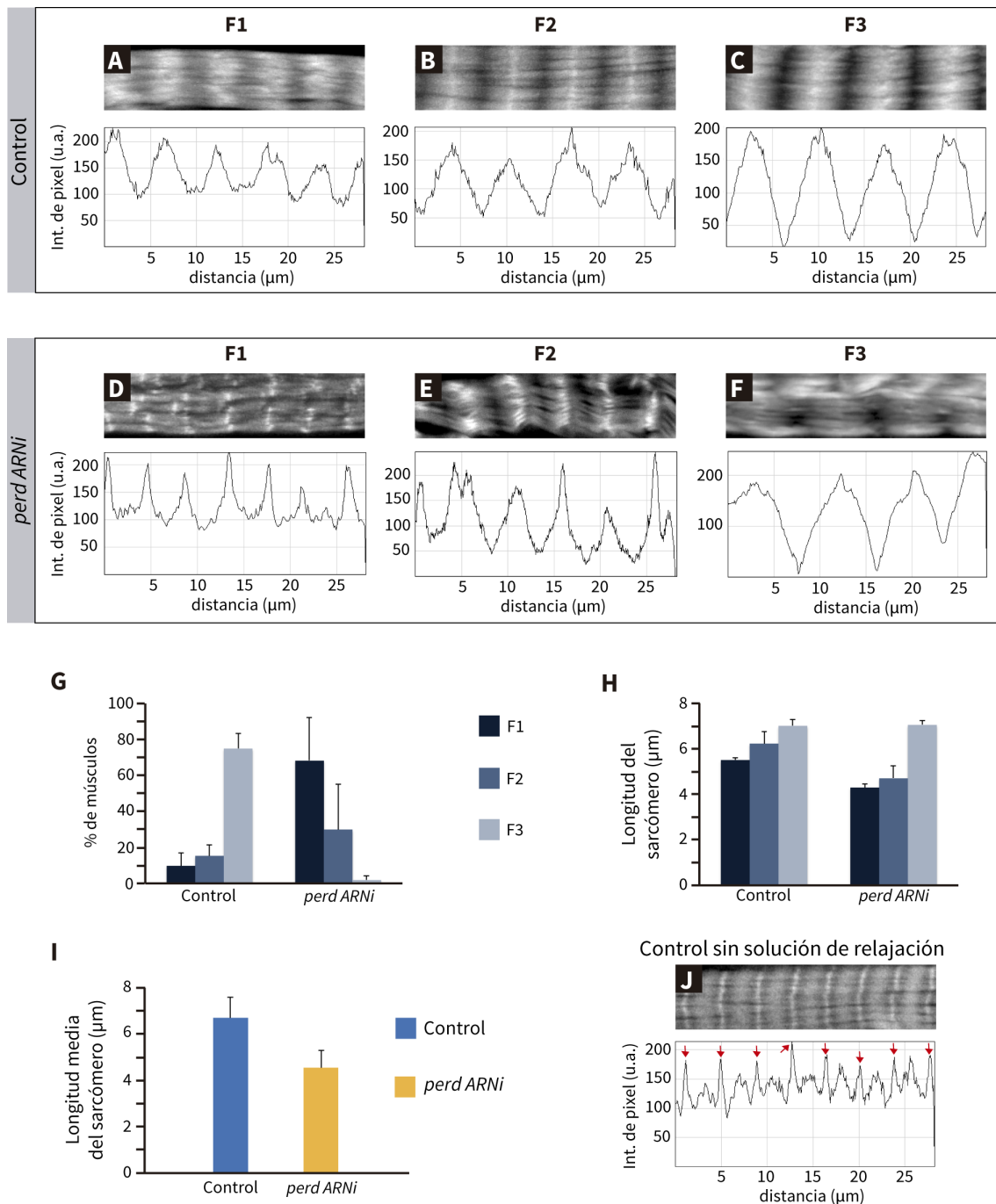
Como se ha comentado, se observó cierta variabilidad en el patrón de la actina tanto en la condición control como en músculos con bajos niveles de *Perd*. Además, los fenotipos de ausencia de banda H y de extensión de Kettin detectados en estos últimos músculos, podría ser explicado tanto por fallos en la diferenciación de los sarcómeros, como por defectos en la función muscular (encontrándose los sarcómeros contraídos). Para distinguir entre ambas posibilidades y cuantificar el fenotipo en cuestión, se decidió analizar el patrón de distribución de la actina empleando una solución de relajación. Esta solución se utiliza habitualmente para inducir el estado de relajación de la estructura sarcomérica, reduciendo la variabilidad de la muestra (Bozler, 1954; Nyland and Maughan, 2000). De este modo, para analizar la organización de los filamentos de actina, se establecieron tres categorías en función del patrón observado: F1, Ausencia de zona H; F2, Detección de la zona H; F3, Zona

RESULTADOS

H claramente definida. En la situación control, a pesar del uso de la solución de relajación, en algunos músculos (9,7 %) no pudo identificarse la separación entre los filamentos de actina provenientes de cada lado del sarcómero (fenotipo F1; Fig. 21A y G). No obstante, esta separación pudo distinguirse en el 15,3 % de los músculos (fenotipo F2; Fig. 21B y G), y apareció claramente definida en el resto de la musculatura (74,9 %) (fenotipo F3; Fig. 21C y G). Por otro lado, la observación de los músculos con niveles reducidos de *Perd* reveló la ausencia de zona H en la mayoría de los casos (68,2 %) (fenotipo F1; Fig. 21D y G). En el resto de los músculos (29,9 %) se pudo diferenciar la terminación de los filamentos de actina (fenotipo F2; Fig. 21E y G), no observándose apenas casos de fibras con zonas H bien definidas (1,9 %) (fenotipo F3; Fig. 21F y G). Estos resultados sugieren que la reducción o ausencia de la zona H que se observa al disminuir los niveles de *Perd*, es debida a defectos estructurales en la diferenciación de los sarcómeros, y no a su estado de contracción.

Figura 21

La expresión de *perd* ARNi produce defectos en el crecimiento y maduración de los sarcómeros. (A-I) Resultados obtenidos mediante incubación de las muestras en solución de relajación. (A-F) Micrografías confocales de músculos dorsales del abdomen al final del desarrollo (80-100h APF), donde se muestran los distintos fenotipos observados en la distribución de la actina en el control (A-C) y en músculos con niveles reducidos de *Perd* (D-F). Para cada caso aparece adjunto el perfil de intensidad de pixel correspondiente a un trazo de la micrografía. u.a.: unidades arbitrarias. F1, Ausencia de zona H; F2, Detección de zona H; F3, Zona H claramente definida. (G) Cuantificación del porcentaje de músculos con los distintos fenotipos para condición experimental. Nótese que la expresión de *perd* ARNi produce la reducción o ausencia de la zona H. (H) Cuantificación de la longitud de los sarcómeros de los músculos de las distintas condiciones experimentales. (I) Media de la longitud de los sarcómeros de los músculos para cada condición experimental ($n \geq 80$ para cada genotipo). Nótese que aunque la longitud del sarcómero es dependiente del grado de relajación del mismo, los sarcómeros formados a bajos niveles de *Perd* son de menor tamaño que en el control. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SD). (J) Micrografía confocal y correspondiente perfil de intensidad de pixel de la estructura sarcomérica de un músculo dorsal del abdomen al final del desarrollo (80-100h APF). Los datos mostrados corresponden a un músculo representativo del grado máximo de contracción observado en el genotipo control sin solución de relajación. Las flechas rojas en el perfil de intensidad de pixel señalan los picos correspondientes a las bandas Z. Nótese la aparición de un bandeo adicional a las bandas Z como resultado del solapamiento de los filamentos de actina. Los músculos aparecen marcados con 488-Faloidina, que marca la actina. Genotipos: control (*tub-GAL80ts/+* ; *mef2-GAL4/+*), *perd* ARNi (*tub-GAL80ts/UAS-perd* ARNi 106680 ; *mef2-GAL4/+*).



Durante el desarrollo de las miofibrillas, tanto en vertebrados (Sanger et al., 2009) como en *Drosophila* (Reedy and Beall, 1993a), los sarcómeros van incrementando su tamaño hasta alcanzar su longitud final. En este proceso, los filamentos gruesos y delgados de los sarcómeros, pasan de formar filamentos continuos a lo largo de todo el sarcómero, a organizarse y presentar la zona H y la zona desnuda respectivamente. En este sentido, el

RESULTADOS

fenotipo sarcomérico de los músculos con bajos niveles de *Perd* (con reducción o ausencia de la zona H y la zona desnuda), recuerda a la estructura descrita para las miofibrillas indiferenciadas o tempranas. Para estudiar si en efecto, las miofibrillas observadas al final del desarrollo en músculos que expresaban *perd ARNi*, presentaban una estructura indiferenciada, se realizó una cuantificación de la longitud de los sarcómeros. En el control se observó una clara correlación entre el patrón de la actina y la longitud del sarcómero. Como era esperable, cuanto más definida fue la zona H mayor fue la longitud del sarcómero (Fig. 21H). Aunque dicha correlación fue también observada en los músculos que expresaban *perd ARNi*, la longitud de estos sarcómeros estaba significativamente reducida (Fig. 21H), con una longitud media de 4,5 μm frente a los 6,7 μm del control (Fig. 21I). Solo en aquellos casos en los que la zona H estaba claramente definida (fenotipo F3; Fig. 21F), los sarcómeros mostraron un tamaño similar al de los músculos control ($\approx 7 \mu\text{m}$) (Fig. 21H), sugiriendo que en estos músculos llegó a completarse la diferenciación de los sarcómeros de las pocas miofibrillas ensambladas.

Como se ha descrito, al final del desarrollo la longitud media de los sarcómeros en músculos con niveles reducidos de *Perd* es de 4,5 μm (Fig. 21I). En el control, solo se observaron algunos músculos con una longitud de sarcómero por debajo de 5 μm en ausencia de solución de relajación (Fig. 21J). En estos casos, se detectó el característico solapamiento de los filamentos de actina resultado del alto grado de contracción (Sanger et al., 2009). Este solapamiento resulta en la aparición de un segundo bandeo a lo largo de las miofibrillas (Fig. 21J) (adicional a las bandas Z (flechas rojas en Fig. 21J)). A pesar de su reducida longitud sarcomérica, no se detectó solapamiento de los filamentos de actina en los músculos que expresaban *perd ARNi* (Fig. 21D). En conjunto, estos resultados indican que la estructura sarcomérica de los músculos con niveles reducidos de *Perd* no se diferencia correctamente, sugiriendo que la función de *Perd* se requiere para completar este proceso.

1.6. *Perd* se requiere de manera específica para la miofibrillogénesis

La expresión de *perd ARNi* durante el desarrollo de la musculatura adulta dorsal del abdomen produjo una reducción en la cantidad de miofibrillas formadas respecto a la situación control (apartado 1.4). Este fenotipo se observó en todas las fibras, independientemente de su orientación y/o posición (Fig. 12C'). Además, estas fibras se unieron en ambos extremos a la epidermis, sugiriendo que el papel de *Perd* en el proceso de miofibrillogénesis podría ser independiente de sus funciones en la guía hacia el tendón y en la formación de la UMT. Sin embargo, la superficie de unión al tendón de estos músculos fue notablemente menor que en el control (Fig. 12A' y C'), llegando incluso a detectarse miosferas cuando se incrementó la eficiencia del ARNi mediante la sobreexpresión de *dicar* (Fig. 13B''), lo que indica que a bajos niveles de *Perd* la unión miotendinosa no se forma correctamente. El proceso de miofibrillogénesis comienza cuando el patrón muscular ha sido establecido, es decir, una vez que los músculos han terminado su migración y han establecido su unión con el tendón. En el caso de la musculatura adulta dorsal del abdomen, el patrón muscular se establece a las 30-40h APF (Currie and Bate, 1991) (Fig. 15A), momento en el que comienza el ensamblaje de las miofibrillas (Weitkunat and Schnorrer, 2014). Con el objetivo de estudiar si una vez establecida la unión miotendinosa, los músculos adultos dorsales del abdomen son o no capaces de formar miofibrillas en condiciones de bajos niveles de *Perd*, se indujo la expresión de *perd ARNi* desde las 30-40h APF.

El análisis al final del desarrollo (≈ 100 h APF) de aquellos músculos que expresaron *perd ARNi* desde las 30-40h APF, reveló claros defectos en la miofibrillogénesis (Fig. 22A-B'). El grosor de estos músculos fue similar al observado cuando se expresó *perd ARNi* desde el inicio del desarrollo (Fig. 22C). No obstante, cuando se expresó el ARNi desde las 30-40h APF, el patrón muscular se estableció normalmente (Fig. 22A y B), y muchos de los músculos presentaron una superficie de unión al tendón similar a la de los músculos control (Fig. 22C). De hecho, el grosor de estos músculos resultó ser independiente del tamaño de la unión miotendinosa (Fig. 22C). Estas observaciones sugieren que la reducción de los niveles de *Perd* una vez establecido el patrón muscular y la UMT, sigue afectando al proceso de

RESULTADOS

miofibrillogénesis, y por tanto, que la función de *Perd* en este proceso es adicional a su papel en la guía hacia el tendón y al establecimiento de la UMT.

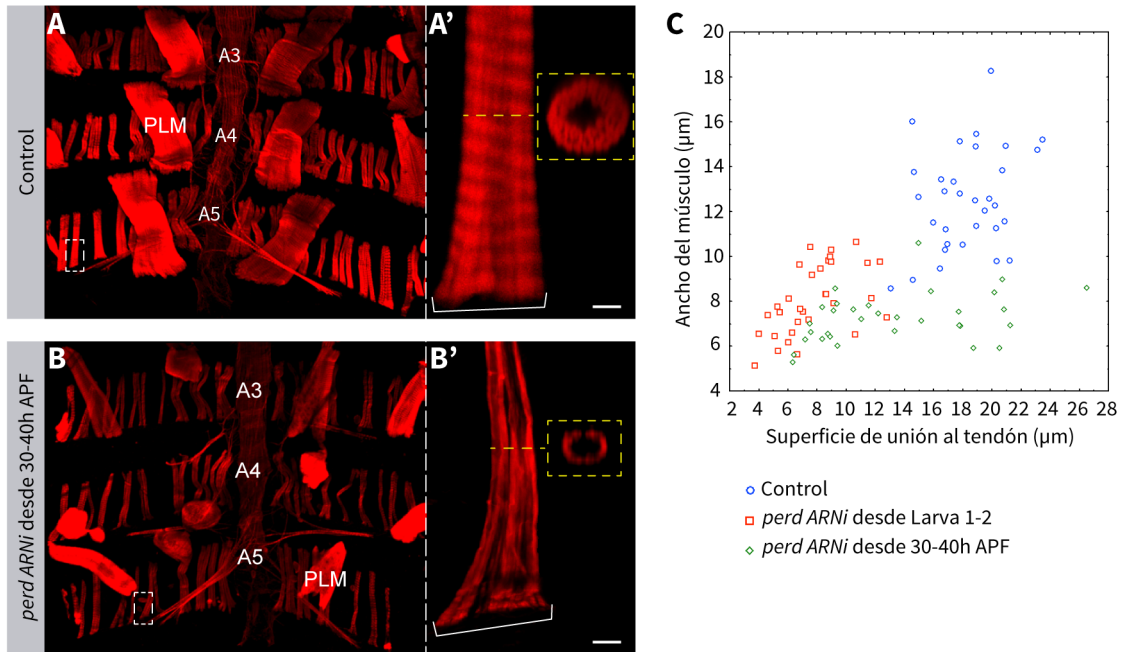


Figura 22

La función de *Perd* en la miofibrillogénesis es independiente del establecimiento del patrón muscular. (A-B') Micrográficas confocales de músculos dorsales del abdomen al final del desarrollo pupal ($\approx 100\text{h}$ APF) en la condición control (A) y cuando se expresa *perd* RNAi desde las 30-40h APF (B). La actina aparece marcada con Rodamina-Faloidina (rojo). (A', B') Magnificación de una fibra adulta de cada condición experimental. Las líneas punteadas amarillas muestran secciones ortogonales de los músculos, y los corchetes blancos delimitan la superficie de unión al tendón. Nótese que a pesar de presentar una superficie de unión al tendón muy similar, la expresión de *perd* RNAi produce músculos con menos miofibrillas que en el control. A3, A4 y A5 indican los segmentos abdominales correspondientes. PLM: músculo persistente larvario. Barras de escala= $5\ \mu\text{m}$. (C) Diagrama de dispersión del grosor de las fibras musculares frente a su superficie de unión al tendón en músculos control, músculos que expresan *perd* RNAi desde el periodo larvario, y músculos que expresan *perd* RNAi desde las 30-40h APF. El grosor se midió en la parte central de cada músculo, mientras que la cuantificación de la superficie de unión al tendón se realizó en el extremo posterior del músculo. Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+*; *mef2-GAL4/+*), *perd* RNAi (*tub-GAL80ts/UAS-perd* RNAi 106680; *mef2-GAL4/+*).

Durante la miogénesis, tras la fusión de los mioblastos, el miotubo resultante produce filopodios en sus extremos en dirección a las células precursoras del tendón. Estas protrusiones se mantienen hasta contactar con dichas células y formar la UMT (Schnorrer

and Dickson, 2004) (Fig. 2). En el caso de la musculatura somática embrionaria de *Drosophila*, la sobreexpresión de *perd* produce que los músculos mantengan la formación de filopodios una vez que han establecido su unión al tendón, e incluso tras las primeras contracciones musculares. Además, estos músculos se contraen mucho menos que los músculos silvestres, por lo que se ha propuesto que el exceso de motilidad producida por la

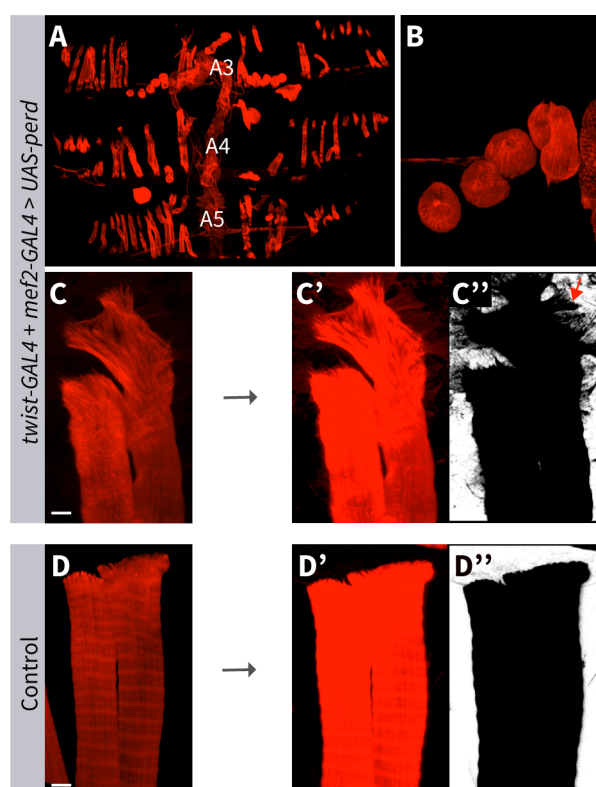


Figura 23

La sobreexpresión de *perd* causa defectos en la UMT pero no en la miofibrillogénesis. (A-D'') Micrografías confocales de músculos dorsales del abdomen al final del desarrollo pupal (80-100h APF). La actina aparece marcada con Rodamina-Faloidina (rojo). La sobreexpresión de *perd* (A-C'') causa la aparición de miosferas (B). Los extremos de los músculos que están anclados al tendón presentan protrusiones (flecha en C''). La estructura de los extremos de algunos de estos músculos aparece desorganizada (músculo de la derecha en C). Estos fenotipos en los extremos de las fibras no se observan en el control (D-D''). A3, A4 y A5 indican los segmentos abdominales correspondientes. C' y D' muestran un incremento de la saturación de las imágenes C y D respectivamente. C'' y D'' muestran en blanco y negro la inversión de colores de C' y D' respectivamente. Barras de escala=5 μ m. Genotipos: *twist-GAL4 + mef2-GAL4 > UAS-perd* (CyO, *twi-GAL4*, *UAS-GFP/+* ; *mef2-GAL4/UAS-perd::HA*), Control (*tub-GAL80ts/+* ; *mef2-GAL4/+*).

sobreexpresión de *perd* interfiere con la maduración del músculo y de la UMT (Schnorrer et al., 2007). En base a estos datos, con el objetivo de estudiar la relación entre el papel de Perd en la UMT y en la miofibrillogénesis, se decidió sobreexpresar *perd* en el adulto.

La sobreexpresión de *perd* se llevó a cabo mediante la inducción de la construcción *UAS-perd* (Schnorrer et al., 2007) con las líneas *twist-GAL4* y *mef2-GAL4*. Mientras que el empleo de *mef2-GAL4* no mostró diferencias con la condición control, cuando se utilizó de manera conjunta con *twist-GAL4* las pupas no llegaron a eclosionar, observándose miosferas adultas en la parte dorsal del abdomen al final del desarrollo pupal (80-100h APF) (Fig. 23A y B). En el resto de la musculatura dorsal, que apareció anclada al tendón, se detectó la existencia de protrusiones en el extremo del músculo (flecha en Fig. 23C’). Además, en algunos casos se observó la desorganización de las miofibrillas en el extremo de algunos músculos (Fig. 23C). Estos resultados indican que la sobreexpresión de *perd* causa defectos en la formación de la UMT, y que tal y como ocurre en el embrión (Schnorrer et al., 2007), produce un exceso de motilidad de las fibras musculares.

La miofibrillogénesis de los músculos que sobreexpresaron *perd* no mostró signos de estar afectada (Fig. 23C y D), y al igual que en el embrión (Schnorrer et al., 2007), al sobreexpresar *perd* en el adulto no se detectaron problemas en la guía del músculo al tendón, apareciendo las fibras correctamente orientadas y segregadas (Fig. 23A). Junto a los datos obtenidos al reducir los niveles de Perd durante la miogénesis (ver arriba), estos resultados apoyan que Perd actúa de manera específica en el desarrollo de la UMT y en la miofibrillogénesis.

1.7. La función de Perd en miofibrillogénesis es independiente de la formación de los complejos de adhesión de integrinas

Las integrinas son receptores transmembrana que conectan la MEC con el citoesqueleto, y que además regulan diversas rutas de señalización celular (Bökel and Brown, 2002; Danen and Sonnenberg, 2003). Estas proteínas han sido extensamente relacionadas con el

desarrollo y la homeostasis tanto de la musculatura esquelética de vertebrados (Gullberg et al., 1998), como de la musculatura somática de *Drosophila* (Brown, 2000; Perkins et al., 2010). En general, el papel de las integrinas en el músculo está principalmente asociado a la formación de la UMT y a la miofibrillogénesis (Bökel and Brown, 2002; Sparrow and Schöck, 2009), procesos en los que, como se ha mostrado previamente en esta tesis, *Perd* también aparece involucrado. En este sentido, se ha observado que *perd* e integrinas interaccionan genéticamente en la formación de la UMT durante la miogénesis de la musculatura somática embrionaria de *Drosophila* (Estrada et al., 2007). Respecto al proceso de miofibrillogénesis, se ha observado que los fenotipos más drásticos producidos por la falta de función de integrinas provocan ausencia de miofibrillas (Volk et al., 1990). No obstante, la mutación de algunas subunidades específicas produce músculos que llegan a formar sarcómeros indiferenciados pero con ausencia de banda H, de manera similar a lo observado en esta tesis cuando se redujeron los niveles de *Perd* (Fig. 20C). Este fenotipo de integrinas se ha observado en músculos embrionarios de vertebrados (Schwander et al., 2003) y de *Drosophila* (Bloor and Brown, 1998). Por otro lado, se ha mostrado que *Perd* e integrinas cooperan en ciertos procesos de señalización celular (Fukushi et al., 2004; Iida et al., 1995). En base a todos estos datos, con el objetivo de estudiar los mecanismos a través de los cuales *Perd* realiza su función durante la miogénesis adulta, se decidió analizar su interacción con las integrinas en este contexto.

Las integrinas son receptores heterodiméricos, compuestos de una subunidad alfa y otra beta. En *Drosophila* existen dos subunidades β , la β PS y la β v. La expresión de β v está restringida al intestino (Brown, 2000), por lo que la única subunidad β presente en otros tejidos es la β PS. Esta subunidad es codificada por el gen *myospheroid* (*mys*), que recibe este nombre debido a que su ausencia produce que los músculos somáticos embrionarios se suelten del tendón y formen músculos redondeados o miosferas (Wright, 1960). De este modo, para reducir los niveles de integrinas durante la miogénesis de la musculatura adulta, se expresó un ARNi dirigido contra el ARNm de *mys*. Al igual que con los *perd* ARNis, la expresión de *mys* ARNi se dirigió con *mef2-GAL4* desde la fase larvaria. El análisis de la musculatura adulta dorsal abdominal al final del desarrollo pupal de aquellos animales que expresaron *mys* ARNi, reveló músculos que habían perdido en mayor o menor medida su

RESULTADOS

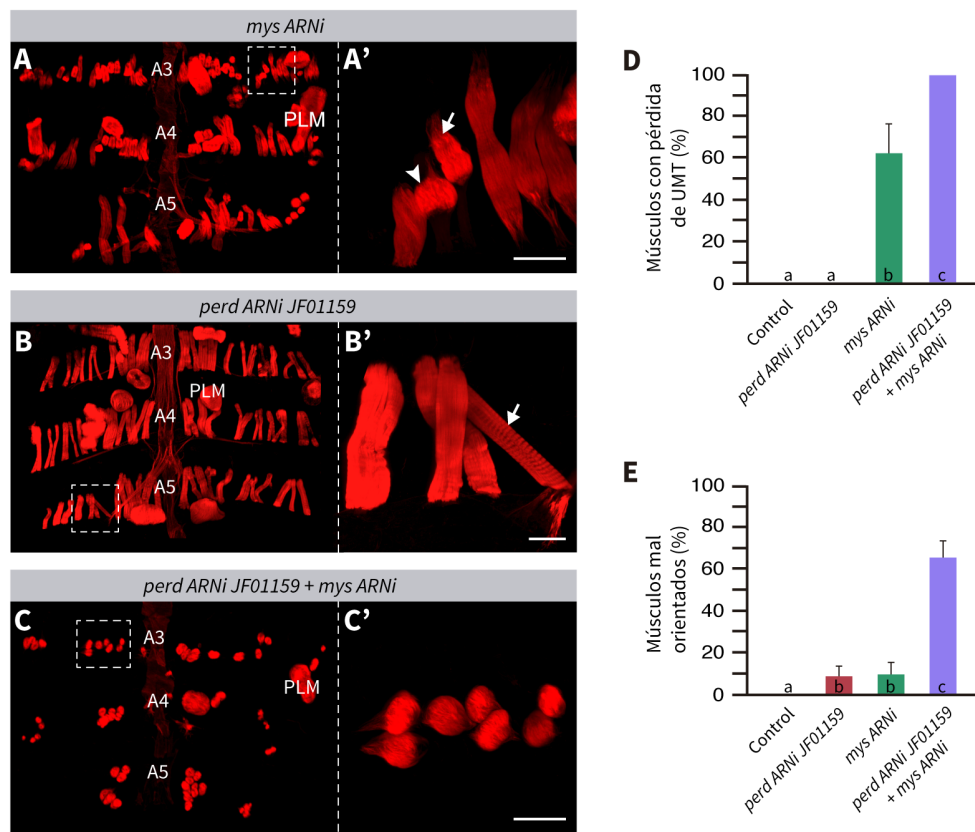


Figura 24

***perd* e integrinas interaccionan genéticamente durante la miogénesis adulta.** (A-C') Micrografías confocales de músculos dorsales del abdomen al final del desarrollo pupal (≈ 100 h APF) expresando *mys ARNi* (A, A'), *perd ARNi JF01159* (B, B') y ambos ARNis conjuntamente (C, C'). La actina aparece marcada con Rodamina-Faloidina (rojo). Nótese que aunque la expresión de *perd ARNi JF01159* produce músculos mal orientados (flecha en B'), y la expresión de *mys ARNi* produce músculos mal orientados (flecha en A') y miosferas (cabeza de flecha en A'), la expresión conjunta de ambas construcciones resulta en un claro incremento de los fenotipos respecto a su expresión individual. A3, A4 y A5 indican los segmentos abdominales correspondientes. PLM: músculo persistente larvario. Barras de escala=20 μ m. (D) Cuantificación del porcentaje de músculos desanclados del tendón (n=9). (E) Cuantificación del porcentaje de músculos mal orientados por hemisegmento (n=9). Las barras etiquetadas con letras diferentes indican grupos estadísticamente significativos. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SD). Genotipos: *mys ARNi* (*tub-GAL80ts/mys ARNi* ; *mef2-GAL4/+*), *perd ARNi JF01159* (*tub-GAL80ts/+* ; *mef2-GAL4/UAS-perd ARNi JF01159*), *perd ARNi JF01159 + mys ARNi* (*tub-GAL80ts/UAS-mys ARNi* ; *mef2-GAL4/UAS-perd ARNi JF01159*).

anclaje al tendón (62,57 %; Fig. 25A' y D), formando en algunos casos miosferas (cabeza de flecha en Fig. 24A'). Además, un 10 % de la musculatura presentó una orientación errónea (flecha en Fig. 24A'; Fig. 24D). Estos datos, muestran que al igual que ocurre en el embrión

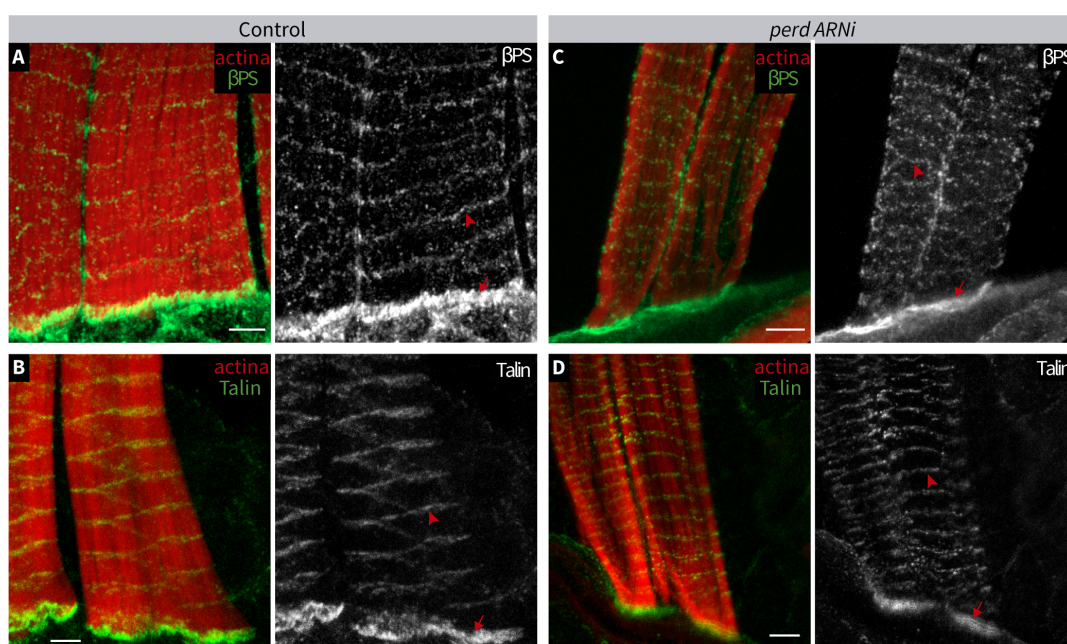
(Estrada et al., 2007), la falta de función de integrinas conlleva defectos en la UMT y en el proceso de guía hacia el tendón.

Para estudiar una posible interacción genética entre *perd* e integrinas durante el desarrollo de la musculatura adulta de *Drosophila*, se expresó simultáneamente *mys ARNi* junto a *perd ARNi*. En este caso se decidió emplear la línea JF01159, ya que como se ha demostrado es menos eficiente que la línea 106680 (Fig. 13A), y por lo tanto produce un fenotipo más sensible a ser potenciado en caso de interacción génica. Mientras que la expresión individual de *mys ARNi* y *perd ARNi JF01159* produjo un 62,57 % y un 0 % respectivamente de músculos con pérdida de la UMT, al expresar simultáneamente ambas líneas se observó que el 100 % de la musculatura formó miosferas (Fig. 24C-D). Este resultado indica que *perd* e integrinas cooperan en el proceso de unión del músculo al tendón. Además, mientras que la expresión de *mys ARNi* o *perd ARNi JF01159* produjo un 10 % o un 9 % de fibras mal orientadas respectivamente (flechas en Fig. 24A' y B'; Fig. 24E), este fenotipo se observó en el 67 % de las fibras cuando se expresaron los dos ARNis (Fig. 24C' y E). Estos resultados muestran que ambos genes interaccionan genéticamente y sugieren que podrían interaccionar en el proceso de guía del músculo al tendón.

Las integrinas desempeñan un papel fundamental en el proceso de miofibrillogénesis (Sparrow and Schöck, 2009). No obstante, cuando se expresó *mys ARNi* no se apreciaron defectos en la cantidad de miofibrillas (Fig. 24A'), indicando que la reducción de los niveles de integrina producidos por *mys ARNi*, son suficientes para alterar la UMT pero no la miofibrillogénesis en los músculos abdominales adultos. Estos resultados podrían sugerir que existe un diferente requerimiento de niveles de integrinas en el proceso de unión del músculo al tendón y en la miofibrillogénesis. Del mismo modo, la reducción parcial de los niveles de *Perd* que produce el *ARNi JF01159* (Fig. 13A) afecta a la guía del músculo hacia el tendón y no a la miofibrillogénesis (Fig. 12B y B'). El hecho de que la expresión conjunta de los ARNis contra *mys* y *perd* produjera que toda la musculatura formase miosferas (Fig. 24C), impidió estudiar si estos genes interaccionaban específicamente en el proceso de miofibrillogénesis.

RESULTADOS

El ortólogo de Perd en mamíferos, NG2, interacciona con integrinas en diversos procesos celulares (NG2) (Fukushi et al., 2004; Iida et al., 1995). Por ello, para estudiar si la función de Perd en miofibrillogénesis está relacionada con la regulación de las integrinas, se analizó si la localización de las integrinas en los músculos adultos era dependiente de Perd. En el músculo esquelético de vertebrados (Clark et al., 2002), y en los PLMs del abdomen de *Drosophila* (Ribeiro et al., 2011), se ha observado que las integrinas aparecen principalmente localizadas en dos regiones del sarcolema: en la región de la UMT y en los costámeros. Estructuras de adhesión que conectan la MEC a los discos Z de las miofibrillas periféricas del músculo. En este trabajo, se observó que la integrina β PS se localiza tanto en la UMT como en los costámeros de los músculos adultos dorsales del abdomen (Fig. 25A). Esta localización no resultó afectada cuando se redujeron los niveles de Perd (Fig. 25B). A nivel intracelular, la activación de las integrinas es mediada por la proteína Talin, codificada en *Drosophila* por el gen *rhea*. La unión de Talin a las integrinas incrementa la afinidad de estas con determinados componentes de la MEC, además de conectarlas con el citoesqueleto de actina (Critchley and Gingras, 2008; Wang, 2012). Por ello, para estudiar en mayor detalle el estado de las integrinas en los músculos con bajos niveles de Perd, se decidió analizar la localización de Talin. Al igual que las integrinas, la localización y los niveles de Talin no mostraron diferencias entre los músculos control y aquellos que expresaban *perd* ARNi, detectándose la presencia de Talin en ambos casos en la UMT y en los costámeros (Fig. 25C y D). Estos resultados sugieren que la función de Perd en la miogénesis de la musculatura adulta de *Drosophila* podría ser independiente de integrinas, abriendo la posibilidad de la existencia de una ruta alternativa y/o paralela de control del proceso de miofibrillogénesis, mediada por Perd.

**Figura 25**

Las integrinas se localizan normalmente en músculos con bajos niveles de *Perd*. (A-D) Micrografías confocales de músculos adultos dorsales del abdomen al final del desarrollo pupal (≈ 100 h APF). En los músculos control, la integrina β PS (A) y Talin (B) se localizan en la UMT (flechas) y en los costámeros (cabezas de flecha). La expresión de *perd ARNi* no revela diferencias respecto al control ni en la localización ni en los niveles de ambas proteínas (integrina β PS (C) y Talin (D)). En A y B la actina se marca con Rodamina-Faloidina. En C y D, la actina se marca con 488-Faloidina. Barras de escala=5 μ m. Genotipos: A (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), B (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi 106680 ; mef2-GAL4/+*), C (*UAS-perd ARNi 106680/+ ; UAS-rhea::mCherry/+*), D (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi 106680 ; mef2-GAL4/UAS-rhea::mCherry*).

1.8. Localización de *Perd* en los músculos adultos

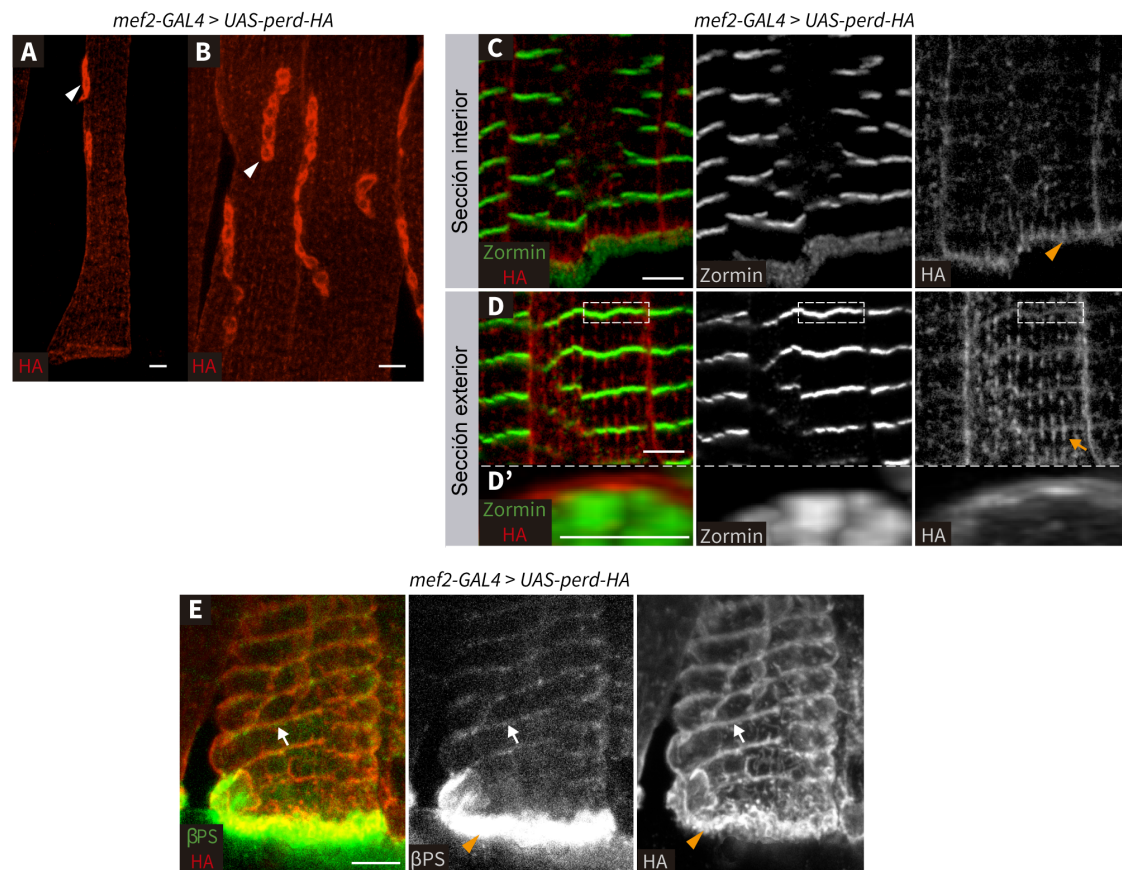
Durante el desarrollo de la musculatura somática embrionaria de *Drosophila*, *Perd* se localiza en el sarcolema de los miotubos, específicamente en la región que se dirige hacia las células precursoras del tendón (Fig. 6). Posteriormente, esta región del sarcolema establece la UMT, observándose un incremento de los niveles de *Perd* (Schnorrer et al., 2007). Tras observar que *Perd* se requiere de manera específica en el proceso de miofibrillogénesis de la musculatura adulta (apartados 1.4 y 1.6) aparentemente de manera

RESULTADOS

independiente y/o paralela a integrinas (apartado 1.7), se decidió estudiar los mecanismos a través de cuales Perd lleva a cabo esta función.

La primera aproximación que se realizó fue determinar la localización de Perd en los músculos adultos. Para ello se empleó la línea *UAS-perd::HA*, debido a que el anticuerpo existente contra Perd (Schnorrer et al., 2007), no funcionó para el marcaje inmunohistoquímico del tejido adulto. Esta construcción permite la expresión dirigida de la proteína Perd fusionada al péptido HA, permitiendo su reconocimiento mediante anticuerpos específicos. A diferencia de cuando se empleó simultáneamente *twist-GAL4* y *mef2-GAL4* (Fig. 23), la expresión de *UAS-perd::HA* mediante *mef2-GAL4* desde el periodo larvario no produjo letalidad pupal ni fenotipo aparente en la musculatura abdominal. La localización de esta versión de la proteína marcada con HA se detectó principalmente en el sarcolema de los músculos adultos dorsales del abdomen. Específicamente, los niveles de Perd fueron especialmente intensos en la región de la UNM (cabeza de flecha en Fig. 26A y B), la UMT (cabeza de flecha en Fig. 26C), describiendo un patrón punteado paralelo a las miofibrillas (flecha en Fig. 26D). Además se observó que HA se localizaba rodeando los discos Z de las miofibrillas de la periferia (Fig. 26D'), colocalizando con la señal costamérica de las integrinas (flecha en Fig. 26E). Este resultado sugiere que Perd::HA se localiza en los costámeros.

La expresión de *UAS-perd::HA*, conlleva una sobreexpresión de Perd, por lo que los resultados obtenidos pudieron deberse, al menos en parte, a la acumulación de la proteína en regiones del músculo donde no se encuentra normalmente. Durante la etapa final de la realización de esta tesis, se desarrollaron en el laboratorio dos nuevas herramientas para la detección de la localización de Perd. Por un lado, se generaron nuevos anticuerpos contra Perd en colaboración con el laboratorio de la Dra. Mar Ruiz Gómez, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Además, se obtuvieron líneas transgénicas de moscas que producen una proteína fusión Perd::GFP, mediante la inserción de las secuencias codificantes de la proteína GFP dentro del gen *perd* (líneas generadas por la compañía BestGene). Para corroborar los resultados obtenidos con la línea *UAS-perd::HA*, se emplearon estas nuevas herramientas para estudiar de forma más precisa la localización de

**Figura 26**

Expresión de Perd-HA en la musculatura adulta en desarrollo. (A-E) Micrografías confocales a las 80-100h APF de fibras adultas dorsales del abdomen que expresan Perd::HA. (A) Visión general de una fibra muscular. (B) Detalle de la localización de Perd::HA en la región de la UNM de varias fibras. Las cabezas de flecha señalan las membranas postsinápticas. (C) Sección confocal de la región central del músculo, donde se observa que Perd::HA aparece localizado principalmente en la región del sarcolema que forma parte de la UMT (cabeza de flecha). (D) Sección confocal de la región externa del músculo. La flecha señala la localización punteada observada para Perd::HA a lo largo del sarcolema. Esta señal es paralela a la orientación de las miofibrillas. Además, se observa un patrón de bandeo circular que rodea el músculo (área punteada). (D') La sección ortogonal de la región punteada en D, muestra que estas bandas rodean las miofibrillas a la altura de los discos Z (visualizados mediante anticuerpos contra la proteína Zormin). (E) La integrina βPS colocaliza con Perd::HA a nivel de la UMT (cabeza de flecha) y de los costámeros (flechas). Barras de escala=5 μm. Genotipo: *tub-GAL80ts/+; mef2-GAL4/UAS-perd::HA*.

Perd en los músculos adultos. Tanto la proteína fusión Perd::GFP como los anticuerpos específicos contra Perd, mostraron señal especialmente intensa en la región de la UMT y de la UNM (asteriscos y cabezas de flecha respectivamente en Fig. 27A y B). Aunque en ambos

RESULTADOS

casos se observó un marcaje difuso en el sarcolema, con los anticuerpos se distinguió la presencia de señal en la región del costámero (flecha en Fig. 27A), mientras que con Perd::GFP no se detectó esta región (Fig. 27B).

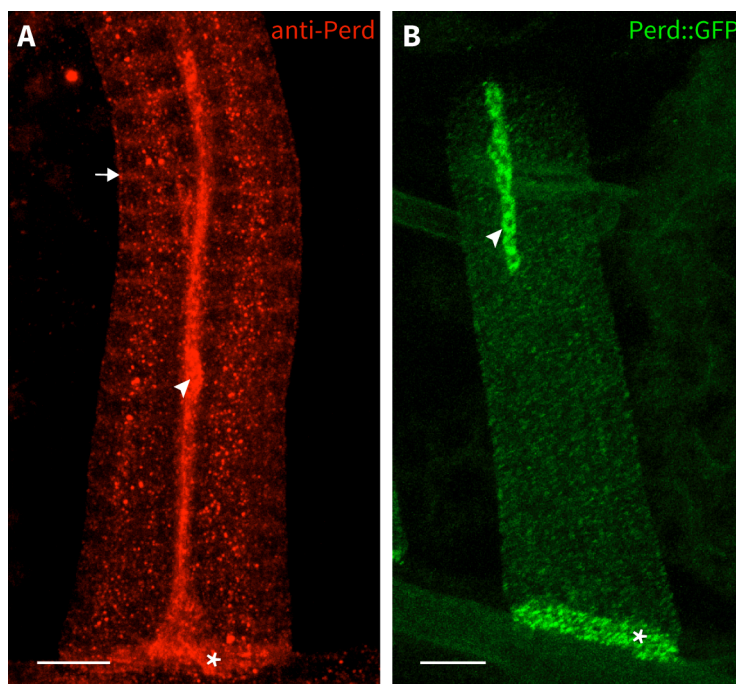


Figura 27

Localización de Perd en la musculatura adulta en desarrollo. (A, B) Micrografías confocales a las 80-100h APF de fibras adultas dorsales del abdomen. Tanto el empleo de anticuerpos policlonales específicos contra Perd (A), como de una cepa transgénica que en la que la Perd está fusionada a GFP (B), muestran señal especialmente intensa en las regiones del sarcolema correspondientes a la UNM (cabeza de flecha) y la UMT (asterisco). Además, también se aprecia la acumulación de anticuerpos contra Perd en los costámeros (flecha en A). Barras de escala=10 μ m. Genotipos: A (*tub-GAL80ts/+; mef2-GAL4/+*), B (*perd::GFP(9)/CyO*).

Aunque del análisis con el anticuerpo y la proteína fusión Perd::GFP no se puede concluir si Perd está en el lado de la neurona o del músculo en la UNM, los experimentos de expresión de *UAS-perd::HA* mediante *mef2-GAL4* (que se expresa en el músculo y no en la neurona) sugieren que Perd se localiza en la membrana postsináptica de la UNM, es decir, en la membrana del músculo. Por tanto, los resultados obtenidos mediante las diferentes aproximaciones experimentales indican que Perd se localiza específicamente en las regiones del sarcolema que forman parte de la UMT y de la UNM, y en menor medida en los

costámeros. La observación de Perd en la UNM resultó de gran interés para el estudio de su función en el proceso de miofibrillogénesis, dada la relevancia atribuida a la innervación durante la diferenciación de algunos músculos (ver a continuación).

1.9. Perd se requiere para el desarrollo de la unión neuromuscular

Mediante el empleo de diferentes estrategias, se observó que Perd se localiza específicamente en la región de la unión neuromuscular (UNM) del sarcolema de los músculos adultos abdominales (apartado anterior). Por tanto, es posible que Perd se requiera para el correcto desarrollo y/o funcionamiento de la UNM, lo que a su vez podría afectar a la propia diferenciación del músculo. De hecho, se ha descrito que la ausencia de sinapsis entre la motoneurona y el músculo afecta a la diferenciación y crecimiento tanto de algunos músculos de mamíferos (Condon et al., 1990; Sohal and Holt, 1980), como de la musculatura adulta torácica (Fernandes and Keshishian, 1998) y abdominal (Currie and Bate, 1995) de *Drosophila*. En base a esta información, primeramente se decidió testar si la reducción de los niveles de Perd en las células musculares afectaba al desarrollo de la UNM.

La UNM es un tipo de sinapsis establecida entre las neuronas motoras o motoneuronas y las fibras musculares (Fig. 3). Esta unión presenta unas estructuras denominadas botones sinápticos, localizados en la parte más distal del axón de la motoneurona, desde donde se liberan neurotransmisores hacia la membrana postsináptica, situada en el músculo. La diferenciación de estas regiones ocurre de manera paralela, existiendo señalización recíproca entre la membrana de la célula nerviosa y muscular durante dicho proceso (Collins and DiAntonio, 2007). En esta tesis, para la visualización de la UNM se utilizó un marcador de los terminales nerviosos, concretamente un anticuerpo contra la peroxidasa de rábano (HRP, del inglés “horseradish peroxidase”), que reconoce de manera específica varios antígenos del axón y de la membrana presináptica (Ashley et al., 2005; Jan and Jan, 1982). En la región dorsal del abdomen de los animales control, se observó que al final del desarrollo pupal (80-100h APF), cada músculo adulto estaba innervado por una o dos ramificaciones del nervio principal que cruza perpendicularmente el hemisegmento (Fig. 10

RESULTADOS

y Fig. 28A). Cada una de estas ramificaciones estaba compuesta de múltiples botones sinápticos (cabeza de flecha en Fig. 28A). De manera similar pero con mayor número de ramificaciones, se encontraron inervados los PLMs (Fig. 28A). Cuando se redujeron los niveles de *Perd*, la inervación de las fibras abdominales resultó notablemente afectada (Fig. 28B). Aunque en estas condiciones se detectó la existencia de inervación de las fibras adultas, los botones sinápticos aparecieron poco definidos o difusos (cabezas de flecha en Fig. 28B). Además, las ramificaciones fueron notablemente más cortas que en los músculos control (Fig. 28B).

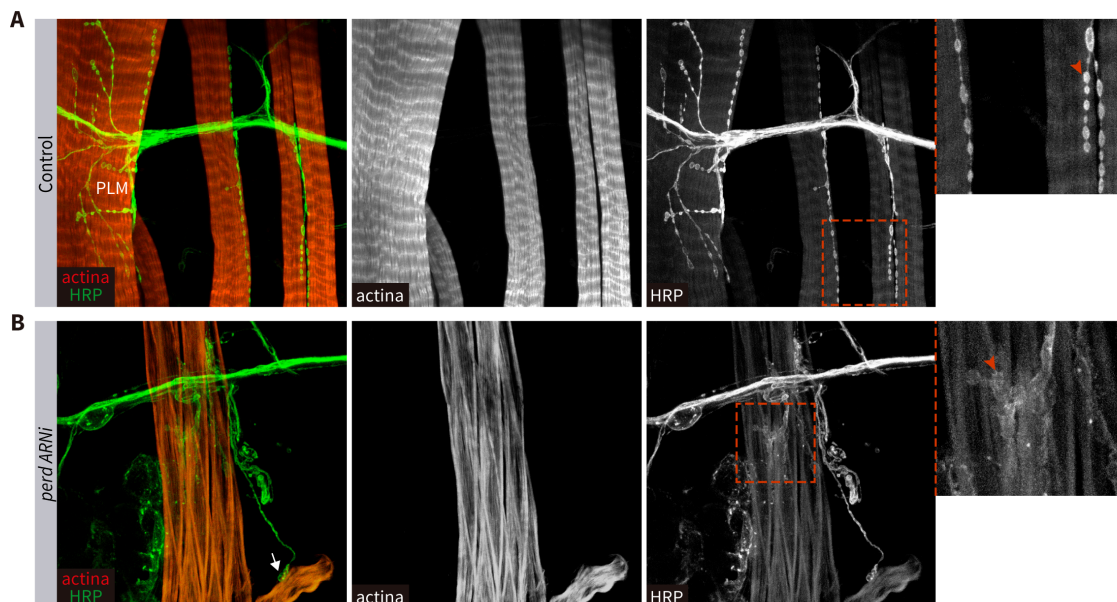


Figura 28

La expresión de *perd ARNi* produce defectos en el desarrollo de la inervación muscular. (A, B) Micrografías confocales de músculos dorsales del abdomen al final del desarrollo pupal (80-100h APF). La actina aparece marcada con 488-Faloidina y los nervios con HRP-Cy3. Parte de la señal de la Faloidina es detectada en el canal del HRP. (A) En la condición control, el nervio principal que atraviesa el hemisegmento inerva a cada musculo mediante ramificaciones que contienen múltiples botones sinápticos. (B) Cuando se expresa *perd ARNi*, la inervación muscular aparece reducida y los terminales sinápticos poco definidos respecto al control. La imagen B muestra 6 músculos adultos agrupados y la flecha señala un único botón que inerva otra fibra que aparece segregada del resto. Las cabezas de flecha en las regiones ampliadas señalan botones sinápticos. Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), *perd ARNi* (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi 106680 ; mef2-GAL4/+*).

En trabajos previos, se ha descrito que la alteración de la morfología y la pérdida de señal de HRP en los botones sinápticos de los músculos adultos dorsales del abdomen, está asociada con una pérdida de la funcionalidad de la UNM (Beramendi et al., 2007). Por tanto, los resultados observados sugieren que la reducción de los niveles de *Perd* en el músculo, afectan al correcto desarrollo y función de la UNM.

El desarrollo de la UNM ocurre de manera paralela al crecimiento del músculo. Esto se ha observado durante el desarrollo de la musculatura esquelética de vertebrados (Sanes and Lichtman, 2001; Wu et al., 2010) y de la musculatura somática embrionaria (Miller et al., 2012) y adulta (Fernandes and Keshishian, 1998) de *Drosophila*. Por tanto, es posible que los defectos observados en la formación de la UNM al reducir los niveles de *Perd* en el músculo (Fig. 28), sean causados indirectamente por la falta de crecimiento por miofibrillogénesis que se observa en estas condiciones de bajos niveles de *Perd* (apartado 1.4). No obstante, otra posibilidad es que ocurra lo contrario, y que la falta de función de la UNM de estos músculos conlleve los defectos mencionados en la miofibrillogénesis. Esta opción es apoyada por varios estudios, que indican que la correcta comunicación entre la motoneurona y el músculo se requiere para el crecimiento de este último (Currie and Bate, 1995; Fernandes and Keshishian, 1998). Con el objetivo de testar si los defectos en el desarrollo de la UNM causados por la expresión de *perd* *ARNi* (Fig. 28) podrían ser responsables de la reducción del crecimiento del músculo en tales condiciones (apartado 1.4), se decidió estudiar en términos generales si la función de la UNM era necesaria para la miogénesis de la musculatura adulta abdominal. Para analizar de manera directa la influencia de la UNM en el desarrollo de estos músculos, se provocó la ausencia de actividad neuromotora. Este análisis fue abordado mediante dos aproximaciones: la inhibición a nivel postsináptico mediante la sobreexpresión de canales de potasio, y la inhibición a nivel presináptico empleando la toxina tetánica (White et al., 2001b).

Inhibición postsináptica de la estimulación neuromuscular

Para analizar la miogénesis en ausencia de estimulación nerviosa se usó la línea *UAS-Kir2.1*. La expresión de esta línea bajo el control de *mef2-GAL4* conlleva un aumento de

canales de K^+ en la membrana del músculo, lo que contrarresta la despolarización de la membrana (generada por la entrada Na^+) mediante el flujo masivo de iones K^+ hacia el exterior de la célula, bloqueando la generación y propagación del potencial de acción en la membrana del músculo (White et al., 2001b), y por tanto la liberación de Ca^{2+} y la contracción muscular. Esta aproximación permitió analizar el efecto de la falta de estimulación nerviosa en la musculatura adulta abdominal.

La expresión de *UAS-Kir2.1* desde la fase larvaria produjo letalidad en los animales, los cuales no llegaron a alcanzar el estadio pupal. La letalidad causada por la sobreexpresión de canales de potasio está correlacionada con el deterioro de la función motora (White et al., 2001a), que resulta esencial para la alimentación y desarrollo de la larva. Por ello, con el objetivo de poder analizar la musculatura adulta abdominal, se indujo la expresión de *UAS-Kir2.1* desde los primeros estadios pupales (≈ 0 -20h APF). De este modo, las pupas llegaron a completar su desarrollo, aunque fueron incapaces de eclosionar, lo que sugiere que su funcionalidad muscular estaba afectada. Sin embargo, el análisis microscópico de la musculatura abdominal de estas pupas al final del desarrollo (≈ 100 h APF) no evidenció defectos en la miogénesis (Fig. 29A-B').

Inhibición presináptica de la estimulación neuromuscular

Por un lado, con los ensayos realizados no puede asegurarse que la sobreexpresión de *Kir2.1* esté inhibiendo la transmisión del potencial de acción en el sistema utilizado. Además, este método permite silenciar la estimulación eléctrica entre la motoneurona y el músculo, pero no la transmisión sináptica (White et al., 2001b). Por ello, se decidió utilizar una segunda aproximación experimental, que consistió en inhibir la estimulación neuromuscular a nivel presináptico mediante el empleo de la toxina tetánica. La cadena ligera de la toxina tetánica (TeTxLC) presenta actividad proteolítica contra la Sinaptobrevina, componente esencial en la formación de las vesículas que liberan los neurotransmisores. De este modo, la expresión de la línea *UAS-TeTxLC* en los nervios

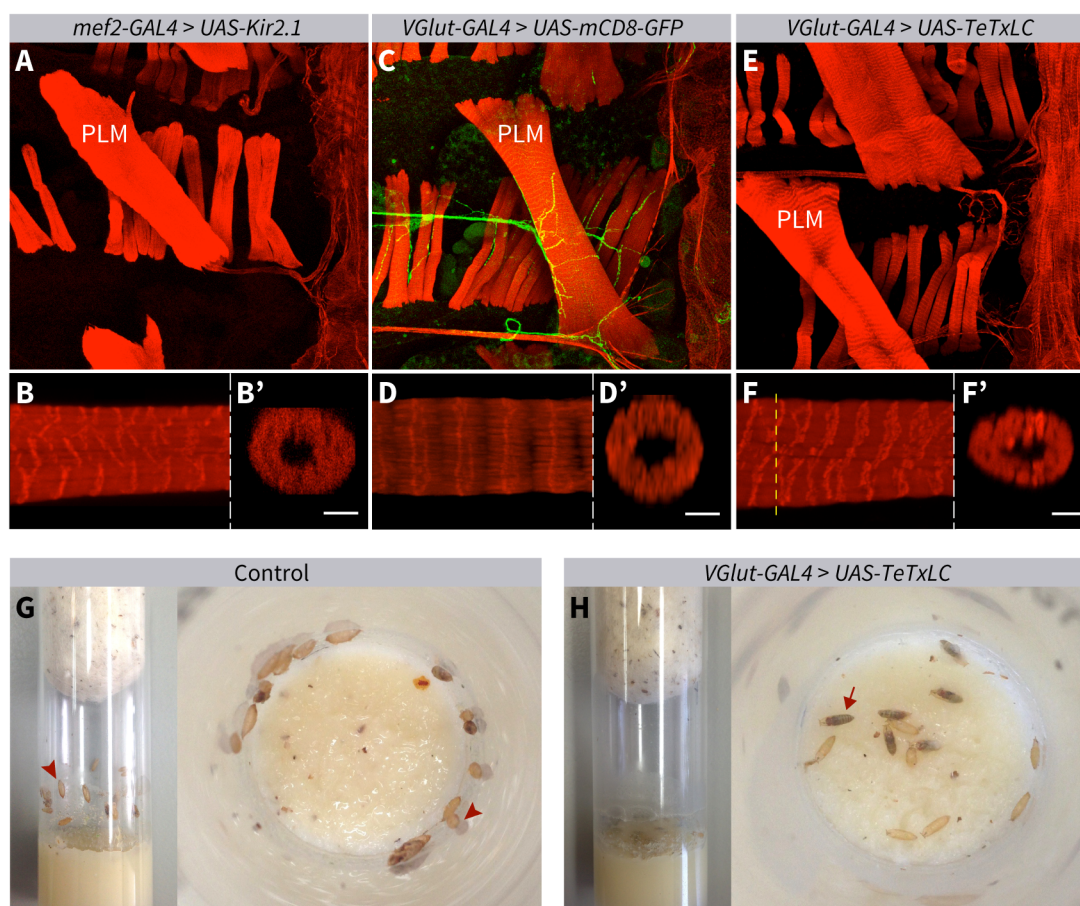


Figura 29

El silenciamiento de la actividad de las motoneuronas no produce defectos en miofibrillogénesis. (A-F') Micrografías confocales de músculos dorsales del abdomen al final del desarrollo pupal (≈ 100 h APF). La actina aparece marcada con Rodamina-Faloidina y los nervios (C) con GFP. B', D' y F' muestran secciones ortogonales de los músculos en B, D y F respectivamente. Barras de escala=5 μ m. (A-B') La sobreexpresión de canales de potasio en los músculos no produce defectos en la miofibrillogénesis. (C-D') La línea *VGlut-GAL4* se expresa en las motoneuronas. La musculatura de estos animales es utilizada como control del proceso de miofibrillogénesis (D-D'). (E-F') La expresión de la toxina tetánica en las motoneuronas no produce defectos en la miofibrillogénesis. (G) En la condición control, las larvas escalan a lo largo de la pared del tubo para formar la pupa (cabezas de flecha). (H) La expresión de la toxina tetánica produce defectos en la movilidad de las larvas, las cuales forman la pupa directamente en el medio de cultivo (flecha). Genotipos: *mef2-GAL4 > UAS-Kir2.1* (*UAS-Kir2.1/+* ; *mef2-GAL4/+* a 29 °C desde ≈ 0 -20h APF), *VGlut-GAL4 > UAS-mCD8-GFP* (*VGlut-GAL4/+* ; *UAS-mCD8-GFP/+* a 29 °C), *VGlut-GAL4 > UAS-TeTxLC* (*VGlut-GAL4/UAS-TeTxLC* a 18 °C), Control (*VGlut-GAL4/+* ; *UAS-mCD8-GFP/+* a 18 °C).

bloquea la transmisión sináptica (Baines et al., 2001; Sweeney et al., 1995). Para dirigir la expresión de la toxina en los nervios que inervan la musculatura dorsal del abdomen se empleó la línea *VGlut-GAL4*. Esta línea expresa la proteína GAL4 en todas las neuronas que

RESULTADOS

usan glutamato como neurotransmisor, lo que incluye todas las motoneuronas en *Drosophila* (Baek and Mann, 2009; Mahr and Aberle, 2006). La expresión del marcador *UAS-CD8-GFP* bajo el control de *VGlut-GAL4* confirmó la expresión de esta línea GAL4 en los nervios asociados a la musculatura dorsal abdominal (Fig. 29C).

La inducción de la expresión de *UAS-TeTxLC* bajo el control de *VGlut-GAL4* mediante incubación a 29 °C produjo letalidad y necrosis de los animales. Aunque la proteína GAL4 es especialmente activa a temperaturas cercanas a los 29 °C, a 18 °C y sin la presencia del represor GAL80, también presenta actividad (Duffy, 2000). De este modo, la expresión de *UAS-TeTxLC* bajo el control de *VGlut-GAL4* a 18 °C produjo larvas con una capacidad de movimiento drásticamente reducida, denotando defectos en su locomoción. De hecho, estas larvas formaron pupa directamente en el fondo del tubo, mientras que en condiciones silvestres las larvas escalan la pared del tubo a una altura variable antes de formar la pupa (Fig. 29G y H). Las pupas que expresaban la toxina tetánica se desarrollaron de manera correcta de acuerdo a sus características morfológicas, pero fueron incapaces de llegar a eclosionar, lo que sugiere defectos en la función motora de los animales. No obstante, la musculatura de estas pupas se formó normalmente, sin fallos aparentes en la miofibrilogénesis (Fig. 29E-F').

Aunque el empleo de los canales de potasio o de la toxina tetánica produjo defectos en la función muscular, siendo las pupas incapaces de eclosionar en ambos casos, y en el caso de la toxina tetánica mostrando también una reducida capacidad de locomoción en el estadio larvario, no se detectaron diferencias respecto a la situación silvestre en el desarrollo de la musculatura abdominal. Estos resultados sugieren que la transmisión sináptica entre la motoneurona y el músculo no se requiere para la miogénesis, y por tanto podrían indicar que el papel de *Perd* en la UNM no es esencial para la miofibrilogénesis de estos músculos. No obstante, este análisis requiere de experimentos que verifiquen la funcionalidad de los métodos empleados en las condiciones descritas.

1.10. *Perd* se requiere para el mantenimiento de la unión miotendinosa de los músculos persistentes larvarios

La expresión de *perd* *ARNi* mediante la construcción *mef2-GAL4* no solo provocó defectos de la miogénesis de la musculatura adulta abdominal, sino que además se observaron miosferas de los músculos larvarios que no son histolizados al final del desarrollo de la musculatura adulta (los PLMs), sugiriendo un defecto en la formación o el mantenimiento de su UMT (Fig. 12B y C). A pesar de que estos músculos sufren una remodelación a nivel intracelular durante el desarrollo pupal, se mantienen unidos al tendón en todo momento durante este proceso (Ribeiro et al., 2011; Wasser et al., 2007) (Fig. 8; Fig. 30A y B). Aunque la expresión de *perd* *ARNi* se indujo desde la fase larvaria, la observación de los PLMs en estadios tempranos del desarrollo pupal (40-50h APF) en

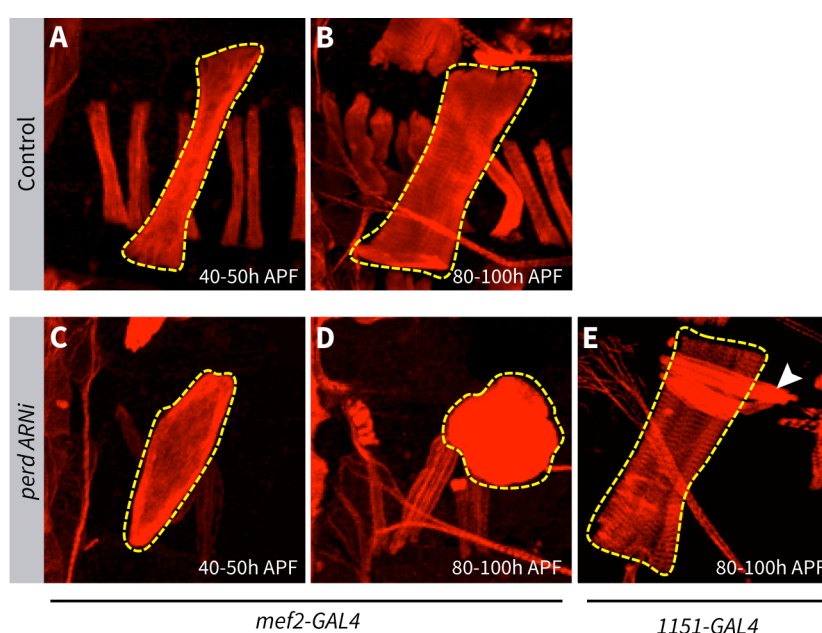


Figura 30

La reducción de los niveles de *Perd* provoca defectos en el mantenimiento de la unión miotendinosa de los PLMs. (A-E) Micrografías confocales de músculos dorsales del abdomen durante el desarrollo pupal. La actina aparece marcada con Rodamina-Faloidina. (A, B) Durante el desarrollo pupal tiene lugar una remodelación estructural de los PLMs (músculos persistentes larvarios), sin embargo éstos se mantienen unidos a las células del tendón durante todo el proceso. (C, D) En organismos que expresan *perd* *ARNi* desde la fase larvaria, a las 40-

RESULTADOS

50h APF (C) los PLMs presentan en ambos extremos una reducción de la superficie de unión a la epidermis. (D) Al final del desarrollo, estos PLMs normalmente pierden por completo la superficie de unión al tendón en ambos extremos, presentando una morfología tipo miosfera. (E) La expresión de *perd* ARNi exclusivamente en la musculatura adulta (mediante 1151-GAL4) produce defectos en la orientación y distribución de estos músculos (cabeza de flecha), mientras que los PLMs muestran una morfología similar a la del control. Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), *perd* ARNi con *mef2-GAL4* (*tub-GAL80ts/UAS-perd* ARNi 106680 ; *mef2-GAL4/+*), *perd* ARNi con 1151-GAL4 (*1151-GAL4/+ ; UAS-perd* ARNi 106680/+).

condiciones de bajos niveles de *Perd*, reveló que la mayoría de estos músculos aún estaban unidos al tendón por ambos extremos (Fig. 30C). Esto indica que la pérdida de la UMT de estos músculos tiene lugar durante el periodo pupal, una vez finalizado el desarrollo de la musculatura larvaria. No obstante, en ese punto del desarrollo (40-50h APF), los PLMs con bajos niveles de *Perd* ya mostraban una reducción de la superficie de contacto respecto al control (Fig. 30C). Cuando se dirigió la expresión del ARNi contra *perd* exclusivamente en la musculatura adulta (empleando 1151-GAL4), los PLMs no mostraron ningún fenotipo (Fig. 30E). Estos resultados, indican que el fenotipo de miosfera observado cuando se empleó *mef2-GAL4* (Fig. 30D) fue causado específicamente por la reducción de los niveles de *Perd* en los músculos larvarios.

Previamente se había demostrado que *Perd* se requiere para la formación de la UMT en el embrión (Estrada et al., 2007), mientras que en esta tesis se ha mostrado como la reducción de los niveles de *Perd* lleva a la formación de miosferas adultas tanto en músculos tubulares (Fig. 12B) como fibrilares (Fig. 14C y D). Los resultados observados en los PLMs muestran que adicionalmente, *Perd* se requiere para el mantenimiento de la UMT. En conjunto, todos estos datos indican que *Perd* tiene un papel esencial en la adhesión de la musculatura somática de *Drosophila* a las células del tendón.

2. Perd en el mantenimiento del tejido muscular

En este trabajo se ha observado que Perd se requiere durante miogénesis de los músculos adultos de *Drosophila*, estando involucrado en el proceso de guía hacia el tendón, la formación de la UMT, de la UNM, y en la miofibrillogénesis (sección anterior). Aunque también se observó requerimiento de Perd durante el mantenimiento de la UMT en los PLMs (aparatado 1.11), debe considerarse que durante el desarrollo pupal estos músculos y las células epidérmicas a las que están unidos, sufren un proceso de remodelación (Ninov et al., 2007; Ribeiro et al., 2011). Esto implica que en cierto modo la función de Perd en el contexto de los PLMs es similar a la observada en el desarrollo de la musculatura adulta y embrionaria (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007), participando en la formación de una nueva unión entre músculo y tendón. El desarrollo de la UMT, las miofibrillas y la UNM requiere la función de Perd, siendo además, estructuras esenciales para el mantenimiento de la función muscular. De hecho, defectos en estas estructuras están asociados a patologías (Davies and Nowak, 2006) y envejecimiento (Demontis et al., 2013a) del tejido muscular. Por tanto, además de estudiar la función de Perd durante el desarrollo de la musculatura adulta de *Drosophila*, en esta tesis se decidió analizar si este proteoglicano transmembrana era requerido para la homeostasis de las fibras musculares.

2.1. Perd se requiere para el mantenimiento de la función muscular

Con el objetivo de estudiar si Perd está involucrado en el mantenimiento de la función muscular, se indujo la expresión de ARNi contra el ARNm de *perd* posteriormente al desarrollo pupal, una vez eclosionados los individuos adultos. De este modo, se redujeron los niveles de Perd tras haber sido completado el desarrollo de la musculatura adulta. Para testar la función muscular de estos animales, se realizó un test de la capacidad de escalada (sección Material y Métodos).

En condiciones silvestres, el envejecimiento va mermando la función muscular a lo largo del tiempo (Demontis et al., 2013a). Por ello, el análisis de los animales control refleja un

RESULTADOS

descenso de la capacidad de escalada conforme aumenta la edad del animal (Perkins et al., 2010) (Fig. 31A y A'). Como control positivo del deterioro de la función muscular, se emplearon animales que expresaban *mys ARNi* o *rhea ARNi*, cuya reducción de los niveles de integrinas o Talin respectivamente, produce una disminución de la capacidad de escalada respecto al control (Perkins et al., 2010) (Fig. 31A y A'). Para reducir los niveles de Perd, se

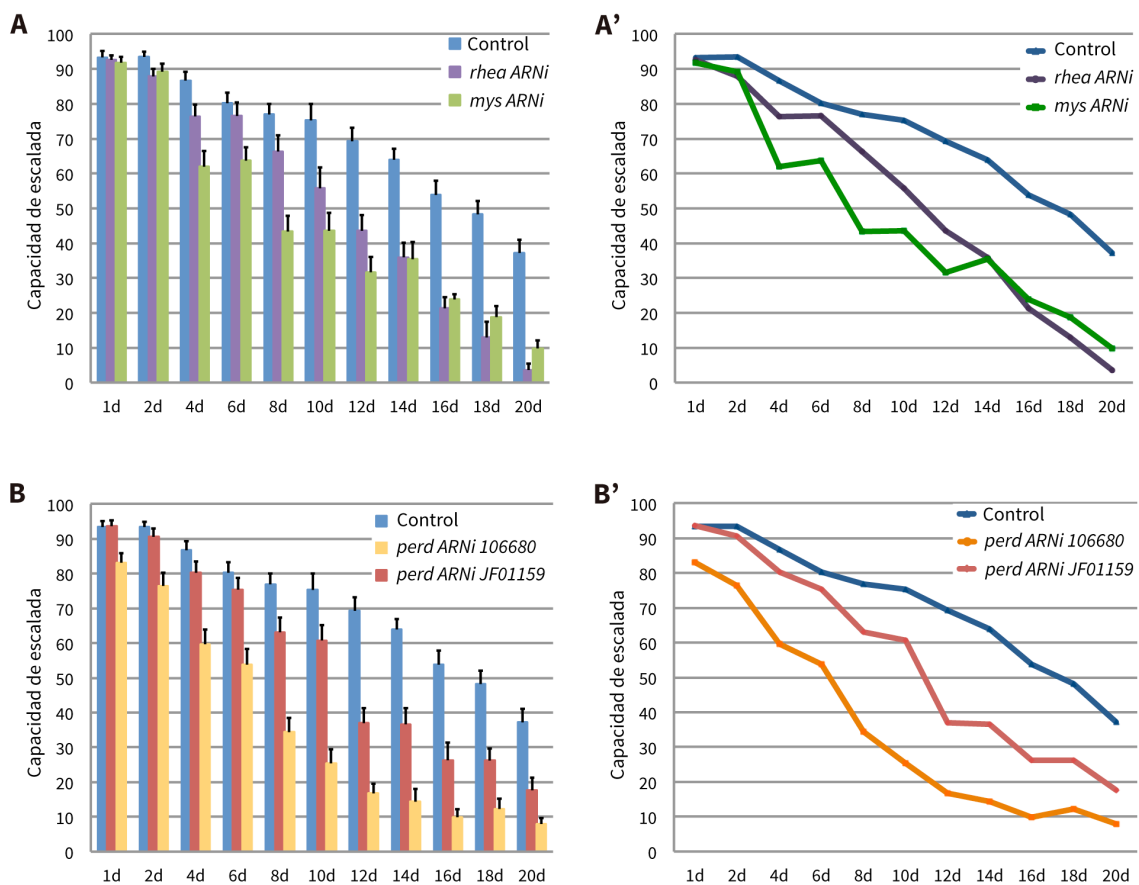


Figura 31

La reducción de los niveles de Perd provoca defectos en la capacidad de escalada. (A-B') Cuantificación del porcentaje de adultos capaces de superar el test de escalada (sección Material y Métodos) ($n \geq 15$). A y B representan la media y el error estándar (SE) correspondiente para cada genotipo a lo largo del tiempo. A' y B' muestran la representación lineal de las medias de A y B respectivamente. d: días. Nótese que la reducción de los niveles de integrinas o de Talin (controles positivos) (A, A'), como la reducción de los niveles de Perd (B, B'), produce una disminución del número de individuos que superan el test de escada respecto a la condición control. Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), *mys ARNi* (*tub-GAL80ts/mys ARNi ; mef2-GAL4/+*), *rhea ARNi* (*tub-GAL80ts/UAS-rhea ARNi ; mef2-GAL4/+*), *perd ARNi* 106680 (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi* 106680 ; *mef2-GAL4/+*), *perd ARNi* JF01159 (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/UAS-perd ARNi* JF01159).

utilizaron las líneas *perd ARNi JF01159* y *perd ARNi 106680*. Los animales que expresaron cualquiera de estas construcciones mostraron un claro descenso de la capacidad de escalada respecto a los individuos control (Fig. 31B y B'), lo que indica que la reducción de los niveles de *Perd* produce un deterioro de la función muscular. La línea 106680 afectó a la capacidad de escalada en mayor medida que la línea JF01159 (Fig. 31B), en concordancia con su mayor eficiencia para reducir los niveles de ARNm de *perd* (Fig. 13A).

2.2. *Perd* se requiere para el mantenimiento de la unión miotendinosa

Tras observar que *Perd* se requería en el mantenimiento de la función muscular, se decidió estudiar su papel en este contexto. Para ello, se realizó un análisis de la estructura de los músculos que expresaban *perd ARNi*, mediante el empleo de marcadores sarcoméricos a lo largo del tiempo. Este análisis no evidenció ningún defecto ni en la UMT (Fig. 32A y B), ni en el alineamiento entre las miofibrillas (Fig. 32C-D'), ni en la estructura sarcomérica (Fig. 32E-H) respecto a los músculos control.

Con el objetivo de estudiar estos músculos en mayor detalle, también se realizó un análisis a nivel ultraestructural de la musculatura torácica mediante microscopía electrónica. Este análisis fue llevado a cabo por nuestra colaboradora la Dra. Marta Carrasco, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. En condiciones silvestres, cada miofibrilla que compone los músculos indirectos del vuelo, presenta un disco Z terminal cuyo grosor es notablemente superior al resto de discos Z. Esta región establece el anclaje del músculo a la cutícula a través de las células del tendón, formando la UMT (Fig. 33A). Aunque los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica no revelaron diferencias en la estructura de los sarcómeros entre los músculos control y aquellos con niveles reducidos de *Perd*, si se observaron diferencias en la región terminal de las miofibrillas (Fig. 33B-C'). Los músculos dorsolongitudinales que expresaban *perd ARNi* presentaron separación o desgarramiento entre el disco Z terminal y el resto de la miofibrilla (flecha en Fig. 33C'). Además, se detectó degeneración de la estructura de microtúbulos de las células

RESULTADOS

del tendón (asterisco en Fig. 33C'). Ambos fenotipos fueron también observados cuando se expresó *mys ARNi* (Fig. 33D y D').

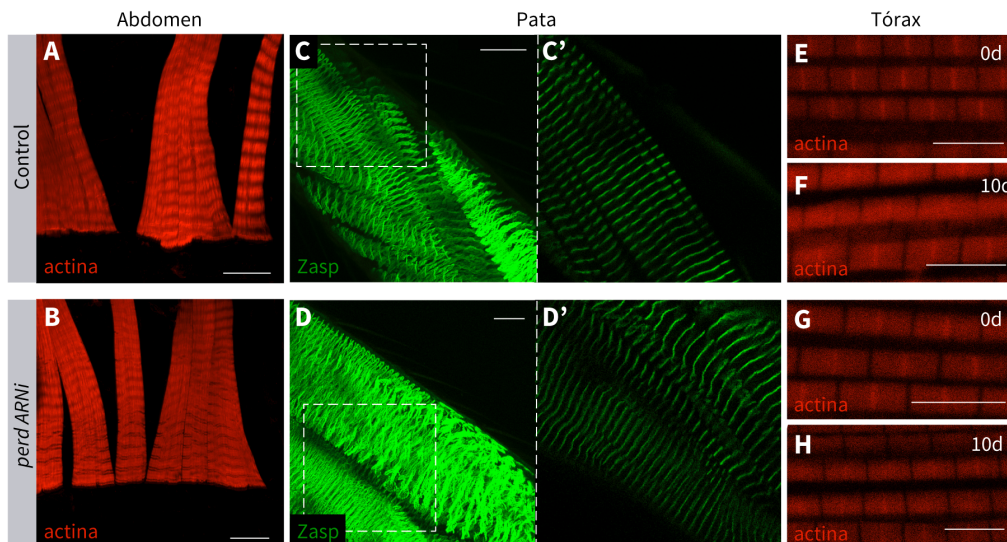


Figura 32

Análisis del efecto de la reducción de los niveles de Perd en el mantenimiento de la musculatura. (A-H) Micrografías confocales de la musculatura adulta de moscas incubadas a 29 °C una vez eclosionadas. La actina aparece marcada en rojo con Rodamina-Faloidina. En verde aparece marcada la proteína sarcomérica Zasp. (A, B) Músculos dorsales del abdomen de animales con 14 días de edad. (C-D') Músculos de la pata de animales con 18 días de edad. (E-H) Miofibrillas de los músculos dorsolongitudinales torácicos de animales recién eclosionados (E y G) y con 10 días de edad (F y H). Genotipos: A, E y F (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), B, G y H (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi 106680 ; mef2-GAL4/+*), C-C' (*UAS-perd ARNi 106680/+ ; Zasp::GFP/+*), D-D' (*UAS-perd ARNi 106680/tub-GAL80ts ; Zasp::GFP/mef2-GAL4*). Barras de escala=20 µm (A-D'). Barras de escala=5 µm (E-H).

Los resultados obtenidos sugieren que Perd, al igual que las integrinas (Perkins et al., 2010; Rooney et al., 2006) (Fig. 33D y D'), se requiere para el mantenimiento de la UMT. No obstante, con el análisis realizado, no puede descartarse que Perd esté involucrado en otros procesos adicionales durante la homeostasis muscular, y por tanto, que los defectos observados en la UMT no sean la causa única y/o principal de la reducida función muscular que presentaron los animales con bajos niveles de Perd (Fig. 31B y B').

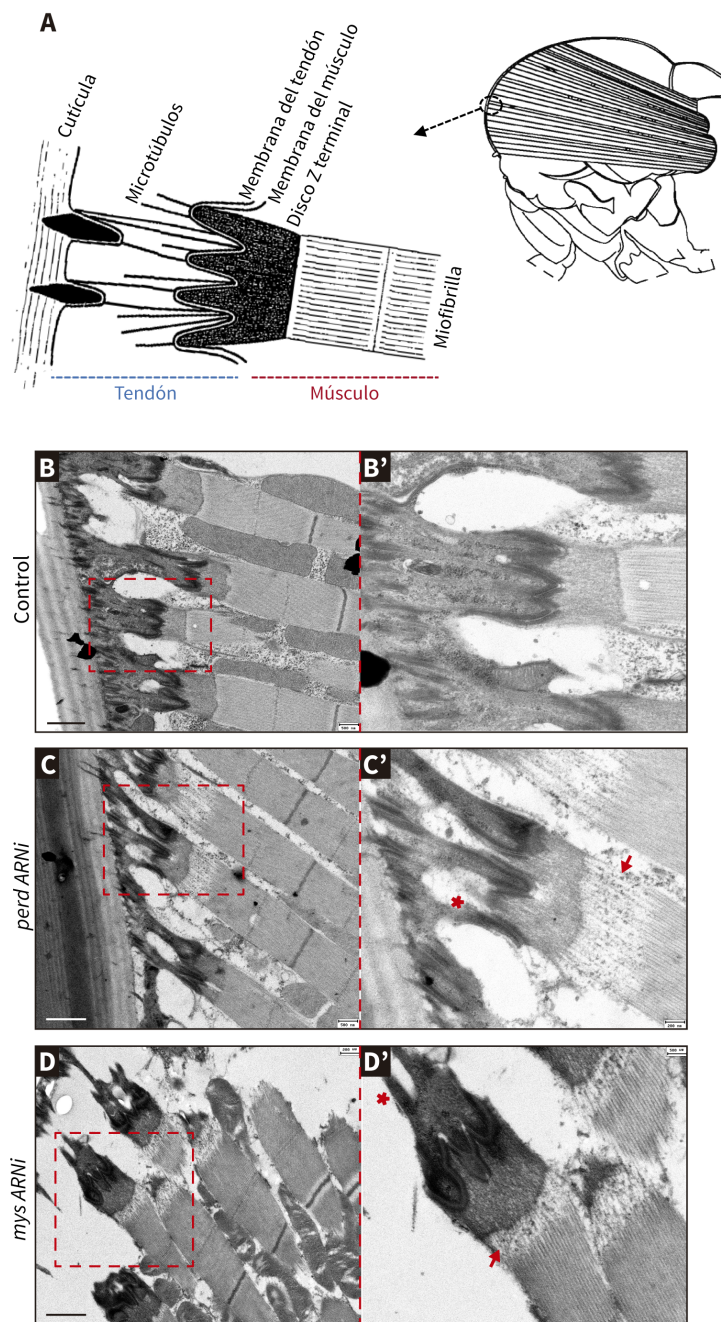


Figura 33

La reducción de los niveles de *Perd* provoca defectos en el mantenimiento de la UMT. (A) Esquema de la UMT de los músculos dorsolongitudinales del tórax (Reedy and Beall, 1993b). (A-D') Imágenes realizadas por microscopía electrónica de la región de la UMT de los músculos dorsolongitudinales a los 4 días desde la eclosión pupal en animales control (B, B'), y animales que expresaban *perd ARNi* (C, C') o *mys ARNi* (D, D') desde la eclosión de la pupa (incubación a 29 °C). Nótese que la expresión de *perd ARNi* o *mys ARNi* produce defectos estructurales a nivel del tendón (asteriscos), así como desgarro de las miofibrillas a nivel del disco Z terminal (flechas). Barras de escala=1 μ m. Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+ ; mef2-GAL4/+*), *perd ARNi* 106680 (*tub-GAL80ts/UAS-perd ARNi* 106680 ; *mef2-GAL4/+*), *mys ARNi* (*tub-GAL80ts/mys ARNi* ; *mef2-GAL4/+*).

3. Análisis de los mecanismos moleculares de Perd durante la miogénesis

Además de analizar la función de Perd durante el desarrollo y la homeostasis de la musculatura adulta de *Drosophila* (apartados 1 y 2), en este trabajo también se abordó el estudio de los mecanismos moleculares por los que este proteoglicano transmembrana lleva a cabo tales funciones. Los proteoglicanos transmembrana generalmente actúan como receptores celulares, estando involucradas en procesos de anclaje y/o señalización entre el medio extracelular y el interior de la propia célula (Couchman, 2010). En este sentido, se ha observado que los ortólogos de Perd en mamíferos, interaccionan y regulan elementos extra e intracelulares (Trotter et al., 2010) (sección Introducción). En base a esta información, para estudiar los mecanismos moleculares responsables de la función de Perd durante la miogénesis, se plantearon dos aproximaciones: analizar la interacción de Perd con moléculas a nivel extracelular, y realizar una búsqueda de proteínas candidatas a interaccionar con su región intracelular.

3.1. Interacciones a nivel intracelular

De manera paralela al análisis de la interacción de Perd con los componentes de la MEC, se realizó una búsqueda de proteínas candidatas a interaccionar con Perd a nivel intracelular. Perd/NG2 contiene un dominio de unión a dominios PDZ en su parte intracelular (Fig. 9), el cual está involucrado en la formación de complejos proteicos y en procesos de señalización intracelular (Jeleń et al., 2003). Aunque se han identificado algunas proteínas que interaccionan físicamente con este dominio de NG2 (GRIP, MUPP1 y Sintenina), aún no se conocen los mecanismos moleculares responsables de su función (Stallcup, 2002; Trotter et al., 2010). En este sentido, la escasa información existente indica que NG2 controla la reorganización del citoesqueleto regulando componentes de algunas rutas de señalización, como p130cas y las rhoGTPasas Rac y Cdc42, (Eisenmann et al., 1999; Majumdar et al., 2003), mediando cambios en la movilidad y la morfología de la célula en

respuesta a señales extracelulares. Conocer la interacción de Perd/NG2 con el citoesqueleto podría permitir conocer los mecanismos por los que este proteoglicano media la unión del músculo a la MEC, regula la producción de extensiones celulares durante el proceso de migración, o controla la miofibrillogénesis. Con el objetivo de estudiar los mecanismos moleculares que subyacen en la función de Perd durante la miogénesis, se decidió tratar de identificar proteínas con dominios PDZ que pudieran interactuar con el dominio de unión a PDZ de Perd.

3.1.1. Búsqueda de proteínas PDZ candidatas a interactuar con Perd

Durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, la proteína PDZ GRIP se requiere en el proceso de guía de los músculos ventrolongitudinales embrionarios hacia el tendón (Swan et al., 2004). GRIP interactúa genéticamente con Perd en este proceso, habiéndose observado además la interacción física entre ambas proteínas (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Por tanto, GRIP era un posible candidato para mediar la función de Perd durante la miogénesis de la musculatura adulta. Para estudiar esta posibilidad, se expresó *GRIP ARNi* en los músculos desde la etapa larvaria. En estas condiciones, se observó letalidad pupal, con algunos casos aislados donde los animales llegaron a eclosionar. La capacidad de locomoción de estos animales que salieron de la pupa, estaba claramente afectada (datos no cuantificados). Sin embargo, el análisis de la musculatura dorsal del abdomen mediante marcaje con Rodamina-Faloidina, no reveló en ningún caso defectos en la miogénesis, observándose que las fibras estaban unidas al tendón, correctamente orientadas y segregadas, y con un grosor similar al de los músculos silvestres (datos no mostrados). Aunque no puede descartarse que la expresión de *GRIP ARNi* produjese defectos estructurales en otros tipos musculares como los torácicos o los de la pata, es probable que los defectos observados en la capacidad de eclosión y en la locomoción del adulto sean debidos a un mal funcionamiento de la UNM. De hecho, la función de GRIP es esencial para la formación de la UNM (Ataman et al., 2006). Estos datos sugieren la existencia de otras rutas independientes de GRIP por las que Perd regula la miogénesis.

RESULTADOS

Con el objetivo de identificar y caracterizar funcionalmente nuevas proteínas PDZ candidatas a interaccionar con Perd, se llevó a cabo una predicción computacional y una posterior validación experimental de posibles interactores. La predicción computacional fue realizada por nuestro colaborador el Dr. Gregorio J. Fernández-Ballester, de la Universidad Miguel Hernández de Alicante. El fundamento de esta aproximación bioinformática residió en modelar la interacción física entre el dominio PDZ-7 de GRIP y el motivo de unión a PDZ

Gen	Fenotipo (Schnorrer et al. 2010)	Gen	Fenotipo (Schnorrer et al. 2010)
CG34418 (<i>sif</i>)	Silvestre	CG6167 (<i>PICK1</i>)	Silvestre
CG30021 (<i>metro</i>)	Silvestre	CG30023 (<i>sprt</i>)	No analizado
CG30483 (<i>prosap</i>)	Silvestre	CG12021 (<i>patj</i>)	Silvestre
CG30084 (<i>Zasp52</i>)	Semiletal	CG10255 (<i>lap1</i>)	Silvestre
CG4905 (<i>syn2</i>)	No analizado	CG7662 (<i>veli</i>)	Silvestre
CG15617	Silvestre	CG6688	No analizado
CG9635 (<i>rhoGEF2</i>)	No analizado	CG5248 (<i>loco</i>)	Silvestre
CG17042	Silvestre	CG15803	Silvestre
CG31349 (<i>pyd</i>)	Silvestre	CG33547 (<i>rim</i>)	Silvestre
CG31158 (<i>efa6</i>)	Silvestre	CG31304	Silvestre
CG34400 (<i>dysc</i>)	Silvestre	CG8464 (<i>htrA2</i>)	Silvestre
CG9491 (<i>dzy</i>)	Silvestre	CG9588	Silvestre
CG6934	Silvestre	CG6509 (<i>dlg5</i>)	Letal
CG34375	Silvestre	CG7152 (<i>syn1</i>)	Silvestre
CG3504 (<i>inaD</i>)	No analizado	CG31772	Letal
CG6416 (<i>Zasp66</i>)	No analizado	CG6619	Silvestre
CG5884 (<i>par6</i>)	Silvestre	CG42230 (<i>bbg</i>)	Silvestre
CG1725 (<i>dlg1</i>)	Letal	CG6498	Silvestre
CG18361 (<i>dsh</i>)	No analizado	CG10362	Silvestre
CG5055 (<i>baz</i>)	Silvestre	CG14950 (<i>fife</i>)	Letal
CG32717 (<i>sdt</i>)	Silvestre	CG6741 (<i>arc</i>)	No analizado
CG42312 (<i>cno</i>)	No analizado	CG30388 (<i>magi</i>)	Silvestre
CG1412 (<i>rhoGAP19D</i>)	No analizado	CG32677 (<i>X11LB</i>)	Capacidad de vuelo reducida
CG11546 (<i>kermi</i>)	Silvestre	CG32758	Silvestre
CG10939 (<i>sip1</i>)	Silvestre	CG14045 (<i>psGEF</i>)	Silvestre
CG6556 (<i>cnk</i>)	Capacidad de vuelo reducida	CG8497 (<i>rhpf</i>)	Silvestre
CG9326 (<i>vari</i>)	Silvestre	CG5462 (<i>scrib</i>)	Letal
CG31045 (<i>mhcl</i>)	No analizado	CG5675 (<i>X11L</i>)	Silvestre
CG1848 (<i>LIMK1</i>)	Silvestre	CG1976 (<i>rhoGAP100F</i>)	No analizado
CG5921	Silvestre		

Figura 34

Listado de genes codificantes para proteínas PDZ candidatas a interaccionar con Perd. Lista de genes candidatos seleccionados a nivel genómico por predicción computacional en base a la interacción conocida entre el PDZ-7 de GRIP y la región C-terminal de Perd (ver detalles en el texto). Para cada gen se indica el código de anotación en el genoma de *Drosophila*, así como la abreviatura del nombre del gen entre paréntesis. La columna fenotipo indica el resultado observado en el análisis funcional masivo de genes realizado por el grupo del Dr. Barry Dickson (Schnorrer et al., 2007), basado en la expresión de ARNs específicos en tejido muscular. En azul: genes cuya reducción funcional en músculo no produce ningún fenotipo; en rojo: genes cuya reducción funcional en músculo produce el fenotipo indicado en cada caso; en verde: genes cuya reducción funcional en músculo no fue analizada en el estudio en cuestión.

de Perd, que ya se había validado experimentalmente (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Así se identificaron los determinantes estructurales específicos involucrados en la unión de estos dominios. Posteriormente, se realizó una búsqueda de todas las proteínas PDZ del genoma de *Drosophila* que presentaban un dominio PDZ con las características identificadas en el PDZ-7 de GRIP. De este modo, se obtuvo una lista de 59 proteínas con dominio PDZ que hipotéticamente podrían unirse a Perd (Fig. 34). Debido a la elevada cantidad de candidatos (59), se decidió filtrar esta lista contrastándola con un análisis realizado a nivel genómico (Schnorrer et al., 2010), en el que mediante la expresión de líneas *UAS-ARNi* bajo el control de *mef2-GAL4*, se analizó el requerimiento de más de 10000 genes en el desarrollo de la musculatura embrionaria y/o adulta de *Drosophila*. De este modo, se descartaron 39 proteínas de la lista de proteínas PDZ candidatas a interactuar con Perd (Fig. 34), debido a que su reducción en el tejido muscular no produjo defectos evidentes en la miogénesis adulta (Schnorrer et al., 2010). Las 20 proteínas restantes, fueron elegidas finalmente para su estudio experimental.

3.1.2. Análisis funcional de las proteínas PDZ candidatas

Tras la identificación de 20 proteínas PDZ candidatas a interactuar con Perd (apartado anterior; genes marcados en rojo y verde en Fig. 34), se decidió testar experimentalmente la función de cada una de ellas. Para ello, se expresaron líneas *UAS-ARNi* específicas contra cada uno de los genes candidatos bajo el control de la construcción *mef2-GAL4*, de manera similar al trabajo mencionado en el apartado anterior (Schnorrer et al., 2010). No obstante, en lugar de expresar el ARNi durante todo el ciclo biológico, en esta tesis se decidió inducir la expresión (mediante incubación a 29 °C) desde la fase larvaria, a fin de afectar únicamente al desarrollo de la musculatura adulta. De este modo, se pudo comparar el fenotipo de falta de función de las diferentes proteínas PDZ con el fenotipo de falta de función de Perd analizado previamente (apartado 1). A fecha de finalización de esta tesis, únicamente llegaron a analizarse 8 de los 20 genes candidatos: *dlg5* (*discs large 5*), *X11LB*, *rhoGEF2*, *scrib* (*scribble*), *CG6688*, *cno* (*canoe*), *Zasp52* y *CG31772*. Los resultados de este análisis son descritos a continuación.

RESULTADOS

La expresión de ARNi contra *dlg5*, *CG6688*, *cno*, *Zasp52* o *CG31772* no produjo ningún defecto aparente respecto al silvestre en la musculatura dorsal del abdomen al final del desarrollo pupal (80-100h APF), analizada mediante microscopia confocal y marcaje con Rodamina-Faloidina. Además, en todos los casos las pupas llegaron a eclosionar normalmente. Por otro lado, la expresión de ARNi contra *X11LB* o *scrib* causó letalidad pupal, aunque tampoco se apreció ningún fenotipo en el desarrollo de la musculatura dorsal del abdomen de estas pupas (datos no mostrados). En cambio, la expresión de *rhoGEF2* ARNi produjo letalidad pupal, observándose algún caso aislado de eclosión y

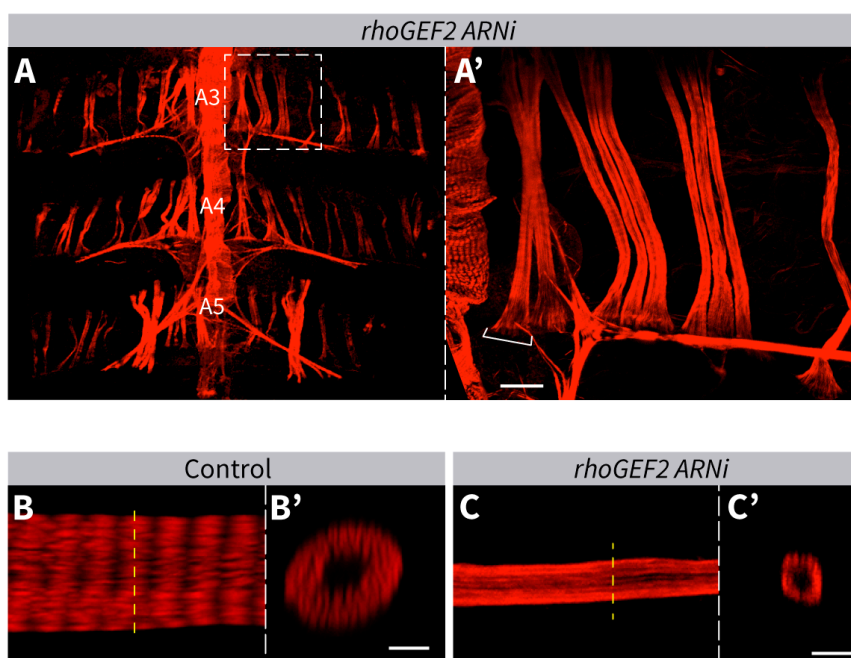


Figura 35

La expresión de *rhoGEF2* ARNi produce defectos en el proceso de miofibrillogénesis. (A, A') Micrografías confocales tras completar el desarrollo pupal (>100h APF), de la musculatura dorsal del abdomen de animales que expresan *rhoGEF2* ARNi, donde la actina (rojo) aparece marcada con Rodamina-Faloidina. (A) Visión general de varios segmentos abdominales. A3, A4 y A5 señalan los correspondientes segmentos abdominales. (A') Magnificación de un grupo de fibras adultas. (B, C') Micrografías confocales de un músculo dorsal del abdomen a las ≈100h APF en la condición control (B, B') y expresando *rhoGEF2* ARNi (C, C'). B' y C' muestran una sección ortogonal de los músculos en B y C respectivamente. Nótese que a pesar de no presentar defectos aparentes en la superficie de unión al tendón (corchete en A'), los músculos que expresan *rhoGEF2* ARNi tienen un grosor muy reducido respecto al control (C respecto a B), mostrando una escasa cantidad de miofibrillas ensambladas (C' respecto a B'). Barra de escala=20 μ m (A'). Barra de escala=5 μ m (B-C'). Genotipos: Control (*tub-GAL80ts/+*; *mef2-GAL4/+*), *UAS-rhoGEF2* ARNi/*tub-GAL80ts*; *mef2-GAL4/+*.

defectos en la miogénesis de la musculatura dorsal abdominal. Los músculos que expresaban *rhoGEF2* *ARNi* presentaron un grosor notablemente inferior al de músculos silvestres, mientras que su orientación y superficie de unión al tendón no resultaron afectados (Fig. 35A y A' respecto a Fig. 12A y A'). La visualización de secciones ortogonales de las fibras mostró que el reducido grosor de las fibras era debido, al menos en parte, a una baja cantidad de miofibrillas respecto al control (Fig. 35C y C' respecto a Fig. 35B y B'). Debido a que este fenotipo recuerda en gran medida al observado cuando se redujeron los niveles de Perd una vez establecido el patrón muscular (Fig. 22B y B'), y que RhoGEF2 se identificó como candidato a interactuar físicamente con el extremo carboxilo de Perd (apartado anterior), estos resultados preliminares sugieren que Perd podría regular específicamente su función en el proceso de miofibrillogénesis vía RhoGEF2. De hecho, se ha mostrado que RhoGEF2 regula el ensamblaje de filamentos de actina y la contractibilidad del complejo actina-miosina durante la morfogénesis embrionaria de *Drosophila* (Grosshans et al., 2005; Padash Barmchi et al., 2005; Simões et al., 2006).

3.2. Interacciones a nivel extracelular

Cada fibra muscular aparece rodeada por matriz extracelular (MEC), cuyos componentes se unen físicamente al citoesqueleto del músculo y soportan la tensión generada durante los ciclos de contracción-relajación. Esta unión es mediada por proteínas transmembrana, habiéndose estudiado principalmente el complejo dependiente de integrinas y el complejo distrofina-glicoproteínas (Carmignac and Durbeej, 2012). Por un lado, el anclaje de la miofibra por ambos extremos a las células del tendón, proporciona el soporte mecánico necesario para mantener su estructura, mientras que la transmisión lateral de la fuerza contráctil a través de los costámeros reduce el daño sufrido por el sarcolema (Ervasti, 2003). La desorganización o ruptura de estos sitios de unión es la causa más habitual responsable de las miopatías humanas, dando idea de su importancia en la función muscular (Kanagawa and Toda, 2006). Adicionalmente, cada vez existe más información indicando que la MEC no sólo actúa como soporte del músculo, sino también en procesos tales como la

diferenciación y migración de mioblastos, o la elongación del músculo (Thorsteinsdóttir et al., 2011).

Perd es una proteína transmembrana cuya mayor parte localiza extracelularmente, presentando en esta región diversos dominios estructurales candidatos a interactuar con moléculas de la matriz extracelular (MEC) (Fig. 9). Considerando además el requerimiento de Perd durante el desarrollo muscular y su localización en sitios del sarcolema especializados en la unión a la MEC, tales como los costámeros y la UMT (apartado 1), se decidió analizar la interacción de Perd con los principales componentes de la MEC durante la miogénesis de la musculatura somática de *Drosophila*.

3.2.1. *perd* y *lanB1* interactúan genéticamente durante la formación de la unión miotendinosa embrionaria

Los estudios del papel de la MEC en la miogénesis de la musculatura embrionaria de *Drosophila* han mostrado que la falta de función de algunos de los componentes de la MEC, como colágenos tipo IV (Borchiellini et al., 1996) o lamininas (Urbano et al., 2009), causan defectos en la unión del músculo al tendón, provocando la aparición de miosferas. Estos resultados son similares a lo observado en embriones mutantes nulos para *perd* (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Con motivo de estudiar la posible interacción de Perd con la MEC, se decidió analizar la relación de Perd con los principales componentes de la MEC. En este sentido, únicamente llegó a estudiarse la interacción entre Perd y lamininas.

Las lamininas son proteínas heterotriméricas que se unen entre ellas formando redes. Las lamininas interactúan directamente con otros elementos de la MEC como Nidogen y Perlecan, y además, se unen a receptores del sarcolema, específicamente a integrinas y a distroglicano. Estas interacciones resultan esenciales para el desarrollo de la MEC, la diferenciación, y la supervivencia celular (Carmignac and Durbeej, 2012). La falta de función de lamininas conlleva letalidad embrionaria. Además, existen diversos tipos celulares que segregan componentes de la MEC (incluyendo lamininas), tales como las células del tendón,

los macrófagos, el cuerpo graso o los propios músculos. Por tanto, para estudiar la interacción de las lamininas con *Perd* durante la miogénesis, se decidió analizar la musculatura embrionaria, donde el papel de *Perd* en miogénesis fue identificado inicialmente (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007).

Embriones con una sola copia funcional de *perd* no presentaron ningún defecto en el desarrollo de la musculatura embrionaria (Fig. 36A y B), mientras que el alelo nulo de *perd* en homocigosis produjo defectos en la unión de algunos músculos al tendón, con la consecuente aparición de miosferas, siendo los músculos ventrolongitudinales los más afectados (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007) (cabeza de flecha en Fig. 36C). Para eliminar la función de las lamininas se empleó una deficiencia del único gen codificante para la cadena beta de la laminina (*lanB1^{DEF}*). Cada molécula de laminina está compuesta de una cadena alfa, una beta y una gamma. De modo que la ausencia de la cadena beta imposibilita la formación de heterotrímeros funcionales (Urbano et al., 2009). Como ya se había observado en trabajos anteriores (Urbano et al., 2009), la falta de función de lamininas produjo defectos en el desarrollo de los músculos embrionarios, observándose espacios vacíos y miosferas allí donde algunos músculos no pudieron establecer la unión con las células del tendón (cabeza de flecha en Fig. 36D), aunque la cantidad de músculos afectados fue notablemente inferior que en ausencia de *Perd*.

Para analizar la interacción entre *Perd* y laminina se empleó una línea recombinante portadora de la deficiencia de *lanB1* (*lanB1^{DEF}*) y de la mutación nula de *perd* (*perd^{F1-3}*). De este modo, se observó que el fenotipo de falta de función de laminina se incrementó notablemente al eliminar solo una copia de *perd* (Fig. 36E), apareciendo numerosas miosferas en la región de los músculos ventrolongitudinales (cabeza de flecha en Fig. 36E). La observación de la musculatura somática de embriones homocigóticos para las mutaciones de *lanB1* y *perd*, reveló un patrón muscular drásticamente afectado, donde la aparición de miosferas de manera generalizada dificultó la identificación de los diferentes músculos (Fig. 36F). Este fenotipo fue notablemente más severo que en embriones mutantes de uno u otro gen (Fig. 36C y D), indicando una fuerte interacción genética entre *perd* y *laminina* durante la formación de la UMT de la musculatura somática embrionaria.

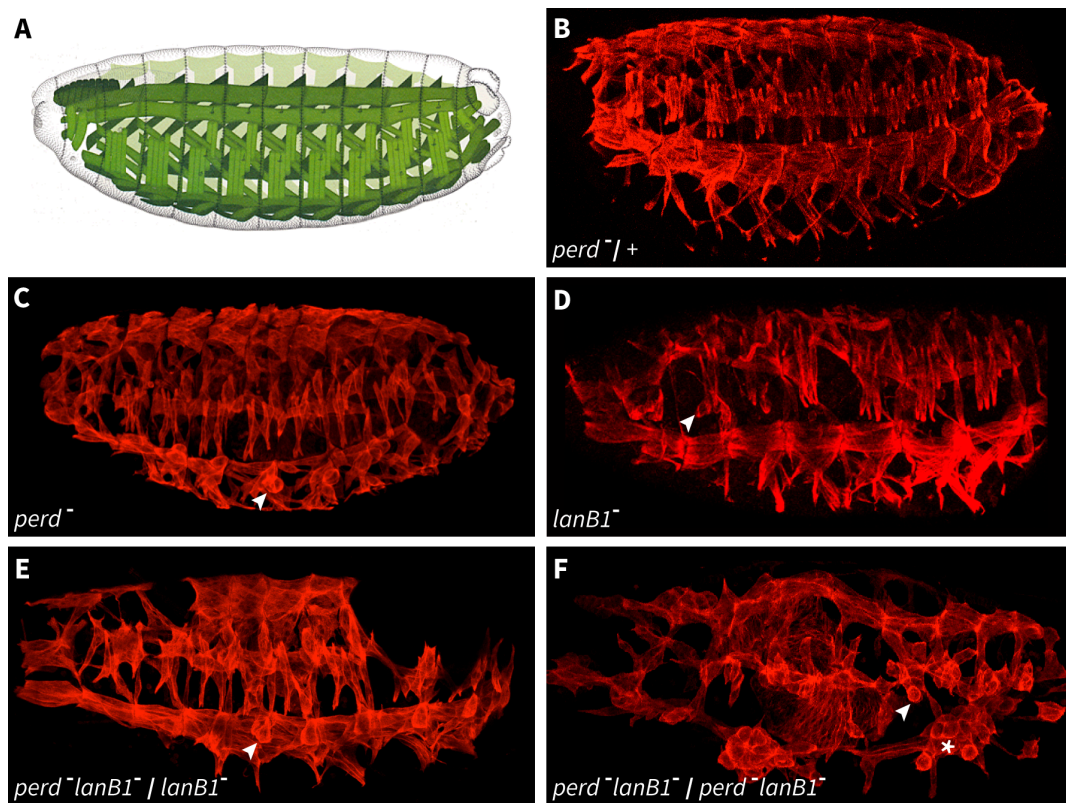


Figura 36

***perD* interacciona genéticamente con *lanB1* durante la unión del músculo al tendón en la musculatura embrionaria.** (A) Representación esquemática del patrón muscular somático embrionario. (B-F) Micrografías confocales de embriones al final del desarrollo embrionario (estadio 15-16), donde los músculos somáticos aparecen marcados con anti-tropomiosina (rojo). (B) Embriones heterocigóticos para *perD* presentan un desarrollo normal de la musculatura somática, donde los músculos aparecen extendidos como resultado de su anclaje por ambos extremos a las células del tendón. (C) El alelo nulo de *perD* en homocigosis causa defectos en la unión de algunos músculos al tendón, especialmente en la musculatura ventrolongitudinal (cabeza de flecha). (D) La falta de función de laminina produce fallos en la unión de los músculos al tendón, los cuales forman miosferas (cabeza de flecha). (E) Embriones homocigóticos mutantes para *lanB1* y heterocigóticos para *perD* presentan un incremento en el número de miosferas y espacios sin músculos respecto a embriones homocigóticos mutantes para *lanB1* (comparar con C). La cabeza de flecha señala miosferas. (F) La ausencia de copias funcionales de *perD* y *lanB1* produce un fenotipo más drástico, donde la ausencia generalizada de UMT conlleva la acumulación de grandes grupos de miosferas (asterisco). Los músculos transversales-laterales, normalmente menos afectados en los mutantes de *perD*, también aparecen en su mayoría formando miosferas (cabeza de flecha). Genotipos: B (*perD*^{F1-3}/CyO, *FLacZ*), C (*perD*^{F1-3}/ *perD*^{F1-3}), D (*lanB1*^{DEF}/*lanB1*^{DEF}), E (*perD*^{F1-3}, *lanB1*^{DEF}/*lanB1*^{DEF}), F (*perD*^{F1-3}, *lanB1*^{DEF}/*perD*^{F1-3}, *lanB1*^{DEF}).

3.2.2. *perd* y *lanB1* interaccionan genéticamente durante la migración de la musculatura embrionaria hacia el tendón.

A algunos elementos de la MEC, como el colágeno IV, se les atribuye un papel principalmente de soporte mecánico, dando estabilidad y resistencia a la MEC (Martinek et al., 2008; Yurchenco et al., 2004). Por otra lado, los estudios realizados tanto en vertebrados como en invertebrados, muestran que el primer componente de la MEC en ser secretado y depositado a lo largo de las superficies celulares es la laminina (Huang, 2003; Yurchenco et al., 2004), que se une físicamente a integrinas y a distroglicano (Kanagawa and Toda, 2006). En este sentido, las lamininas se han identificado no sólo como moléculas de soporte para la contracción del músculo maduro, sino también como moléculas involucradas a lo largo del proceso de miogénesis desde las etapas tempranas (Sanes, 2003; Thorsteinsdóttir et al., 2011). Por otra parte, como se ha mostrado en esta tesis, *Perd* está involucrado tanto en el proceso de guía de los músculos adultos hacia el tendón como en la formación de la unión entre ambos tipos celulares (apartado 1). Estas funciones han sido descritas también en la musculatura embrionaria (Estrada et al., 2007). Por tanto, tras observar la interacción genética entre *perd* y *laminina* durante la miogénesis de la musculatura somática (apartado anterior), se decidió analizar si esta interacción ocurría durante la guía del músculo hacia tendón, en el establecimiento de la UMT, o en ambos procesos.

Debido a la complejidad del patrón muscular resultante en los embriones dobles mutantes para *perd* y *lanB1* (Fig. 36F), se decidió analizar un único músculo durante el desarrollo para facilitar el análisis del fenotipo en distintos estadios embrionarios. Con este objetivo se empleó una línea que expresa la proteína GFP específicamente en el músculo ventrolongitudinal 1 (VL1) de cada segmento (*5053-GAL4, UAS-GFP*) (Estrada et al., 2007; Ritzenthaler et al., 2000) (Fig. 37A). De este modo, se realizó un análisis del desarrollo muscular desde el estadio 13 hasta el estadio 16, abarcando la fase de migración del miotubo y la formación de la UMT (Fig. 6). De acuerdo a la morfología del músculo se establecieron varias categorías: silvestre, mal orientado, proyección anómala y miosfera (Fig. 37B).

RESULTADOS

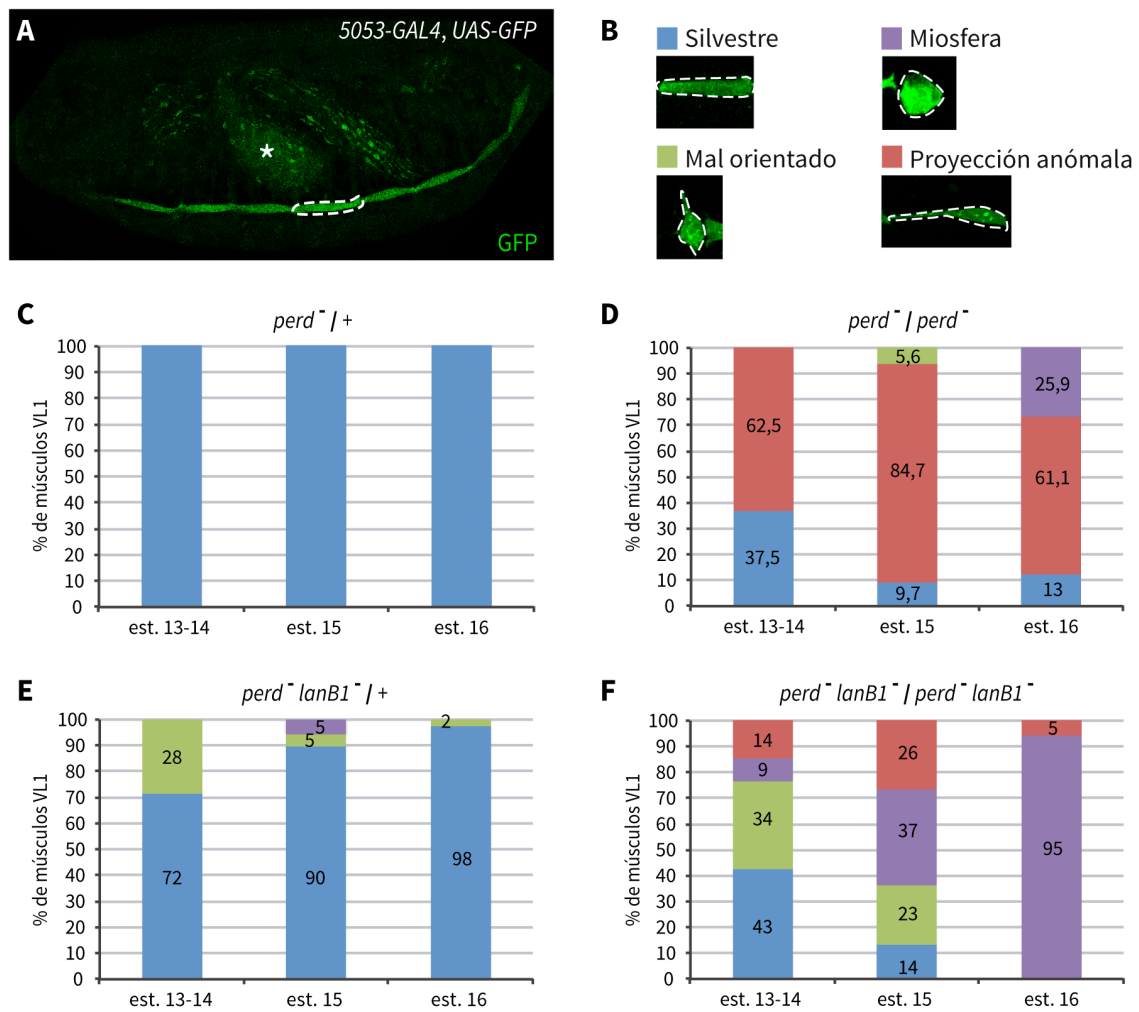


Figura 37

perd interacciona genéticamente con **lanB1** durante la guía hacia el tendón y la formación de la UMT del músculo VL1. (A) Micrografía confocal de un embrión al final del desarrollo embrionario (estadio 16) portador de la construcción "5053-GAL4, UAS-GFP", donde aparece marcado el músculo ventrolongitudinal 1 (VL1) de cada segmento (trazo punteado). También se observa señal en el intestino (asterisco). (B) Micrografías confocales representativas de los diferentes fenotipos observados para el músculo VL1 durante el análisis de los genotipos indicados en C-F. (C-F) Cuantificación del porcentaje de los diferentes fenotipos del músculo VL1 (B) a lo largo del desarrollo embrionario para los genotipos indicados en cada caso. Se muestra el sumatorio de todos los VL1 observados en los embriones contabilizados. n≥3 para cada estadio y genotipo. est.: estadio. Genotipos: A (5053-GAL4, UAS-mCD8::GFP/+), C (*perd*^{F1-3}/CyO, *FLacZ* ; 5053-GAL4, UAS-mCD8::GFP/+), D (*perd*^{F1-3}/ *perd*^{F1-3} ; 5053-GAL4, UAS-mCD8::GFP/+), E (*perd*^{F1-3}, *lanB1*^{DEF}/+ ; 5053-GAL4, UAS-mCD8::GFP/+), F (*perd*^{F1-3}, *lanB1*^{DEF}/ *perd*^{F1-3}, *lanB1*^{DEF} ; 5053-GAL4, UAS-mCD8::GFP/+).

En la situación control (embriones con una copia funcional de *perd*) (Fig. 37C), los músculos VL1 se extienden por ambos extremos hacia sus sitios de unión, las células del

tendón localizadas en las regiones intersegmentales (Estrada et al., 2007). En embriones mutantes nulos para *perd* (Fig. 37D), durante la fase de guía hacia el tendón (estadio 13-14), la mayoría de los músculos VL1 (62,5 %) en lugar de extenderse normalmente producen proyecciones delgadas hacia la región intersegmental (proyección anómala en Fig. 37B). Como resultado de los defectos en el establecimiento del contacto con las células del tendón, en el estadio 15 se produce un incremento de músculos con esta morfología (84,7 %), observándose también algunos músculos (5,6 %) que emiten sus proyecciones en dirección errónea (mal orientado en Fig. 37B). Finalmente en el estadio 16, parte de todos estos músculos con defectos en el desarrollo, acaban formando miosferas (Estrada et al., 2007) (miosfera en Fig. 37B).

En presencia de una única copia funcional de *perd* y *lanB1* (Fig. 37E), se observó que un 28 % de los músculos VL1 producían proyecciones en direcciones erróneas. Conforme avanzó el desarrollo (estadio 16), casi la totalidad de los músculos (98 %) acabaron uniéndose normalmente al tendón, mientras que algunos músculos (2 %) aún producían proyecciones en direcciones erróneas. Estos datos indican que la reducción conjunta de una dosis génica de *perd* y *lanB1* conlleva defectos en el proceso de guía del músculo hacia el tendón, mientras que la reducción de una dosis de *perd* no presenta defectos.

Embriones dobles mutantes para *perd* y *lanB1* (Fig. 37F) mostraron, ya desde el estadio 13-14, alteraciones en el desarrollo de más de la mitad de los músculos VL1. Además de músculos que producían proyecciones mal orientadas (34 %) y músculos con proyecciones anómalas (14 %), se observó que el 9 % de los músculos formaban miosferas. Considerando que en estas etapas los músculos se encuentran en fase de migración, este dato sugiere que la falta de función de *Perd* y *Laminina* reduce la capacidad de los músculos VL1 para la detección de señales de guía y/o la producción de filopodios. Posteriormente, en el estadio 15, parte de los músculos que aparentemente se estaban desarrollando con normalidad, también presentaron defectos en su desarrollo (reducción de músculos VL1 con fenotipo silvestre del 43 % al 14 %). Aunque en este punto del desarrollo el porcentaje de músculos VL1 afectados fue similar al observado en embriones mutantes solo para *perd* (Fig. 37D), la cantidad de miosferas y músculos que producían proyecciones en direcciones erróneas fue notablemente superior. Estos resultados indican que en condiciones de falta de función de

perd, la ausencia de laminina produce en los músculos una pérdida de la capacidad de guía hacia el tendón, así como del establecimiento de la UMT. Finalmente, en el estadio 16, casi todos los músculos VL1 formaron miosferas (95 %). El resto (5 %) se mantuvieron unidos al tendón aunque de manera anómala, con una superficie de anclaje claramente inferior que en condiciones silvestres.

Aunque en el apartado anterior ya se había observado que *perd* y *laminina* interaccionan genéticamente durante la miogénesis, los resultados obtenidos mediante el análisis de los músculos VL1 sugieren que dicha interacción sucede de manera específica en el proceso de guía del músculo hacia el tendón, así como en el proceso de diferenciación de la UMT. No obstante, para verificar esta conclusión queda pendiente el análisis de los músculos VL1 en embriones mutantes solo para *lanB1* en estadios tempranos. No pudiendo descartarse con los ensayos realizados hasta el momento, que el alto nivel de músculos con filopodios mal orientados que se observó en el doble mutante (Fig. 37F respecto a Fig. 37D) se deba únicamente al papel de la laminina en el proceso de guía, y no a la interacción ente *perd* y *laminina*. No obstante, esta posibilidad parece poco probable, ya que en embriones mutantes para laminina casi toda la musculatura se forma correctamente (Fig. 36D). En cualquier caso, los datos obtenidos indican que la laminina está involucrada en el proceso de guía del miotubo hacia el tendón en la musculatura somática.

3.2.3. *Perd* no es esencial para la acumulación de laminina en la unión miotendinosa

Tras observar la interacción genética entre *perd* y *laminina* durante la miogénesis de la musculatura embrionaria, se decidió estudiar si *Perd* es un receptor de la laminina en la UMT. Para ello, se analizó la localización de laminina en ausencia de *Perd*. La laminina se marcó mediante el empleo de anticuerpos específicos contra la subunidad beta (*LanB1*). En condiciones silvestres, en los estadios 15-16 del desarrollo embrionario, los músculos somáticos han establecido su unión con las células del tendón (Weitkunat and Schnorrer, 2014) (Fig. 6). Esta unión está mediada por la MEC, entre cuyos componentes se observa

laminina (Urbano et al., 2009) (cabeza de flecha en Fig. 38A). El análisis de embriones mutantes nulos para *perd* (portadores del alelo *perd*^{F1-3} en homocigosis), mostró una clara disminución de la cantidad de MEC en las regiones intersegmentales respecto al control. Sin embargo, esto se debió a la ausencia de anclaje de los músculos al tendón en tales regiones, como consecuencia de la falta de función de Perd (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007) (Fig. 35B, D y F). De hecho, aquellos músculos que permanecieron unidos al tendón mostraron acumulación de laminina de manera específica en la UMT (cabeza de flecha en Fig. 38B). Estos resultados, sugieren que Perd no es un receptor esencial para acumulación de laminina en la UMT, o que bien existen otros receptores cuya función sería redundante a la de Perd en este sentido.

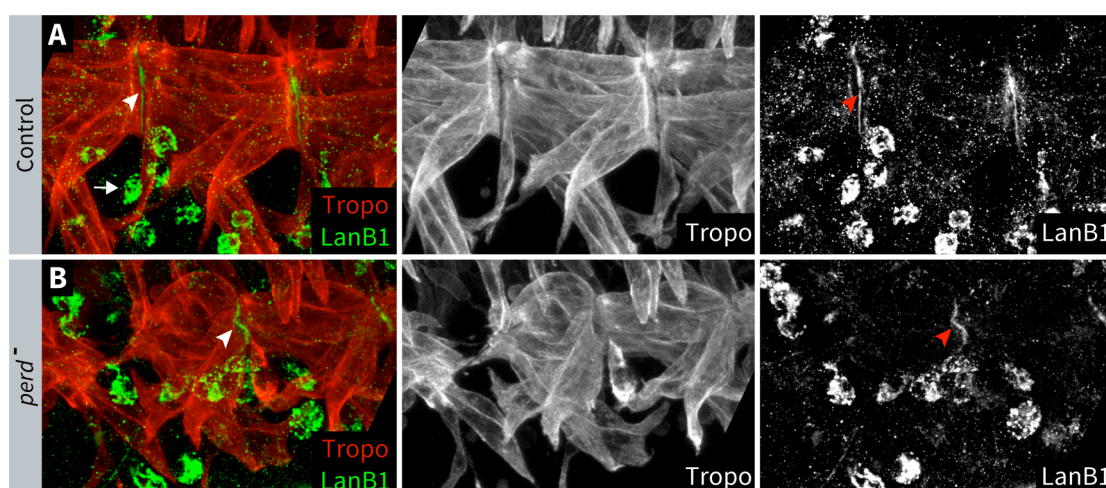


Figura 38

La falta de función de Perd no es esencial para la localización de los principales componentes de la MEC en la UMT. (A-B) Micrografías confocales de embriones al final del desarrollo embrionario (estadio 15-16), donde los músculos somáticos (rojo) aparecen marcados con anti-tropomiosina, y la laminina (verde) con anti-LanB1. En la condición control, la laminina localiza en la UMT (cabeza de flecha). Aunque también aparece en los macrófagos (flecha). (B) En embriones mutantes para *perd*, a pesar de la reducción o ausencia de UMT en determinados casos, se observa la localización de laminina, en aquellas regiones donde los músculos permanecen anclados al tendón (cabeza de flecha). Genotipos: A (*perd*^{F1-3}/CyO, *FLacZ*), B (*perd*^{F1-3}/*perd*^{F1-3}).

Discusión

La correcta formación de la musculatura resulta esencial para la viabilidad de la mayoría de los animales, permitiendo ejecutar el movimiento de diferentes órganos y tejidos del organismo. La miogénesis es un proceso complejo, donde tienen lugar múltiples y diversos procesos celulares, los cuales deben estar correctamente orquestados para que el músculo llegue a ser funcional. Una de las particularidades del tejido muscular, es el estrés mecánico que debe soportar durante los ciclos de contracción-relajación. Esto implica que, aún cuando el músculo llega a diferenciarse, la carencia o mal funcionamiento de determinados componentes moleculares causa un deterioro progresivo e irreversible de su estructura. En este sentido, se han identificado multitud de distrofias musculares congénitas (Davies and Nowak, 2006), resultando de especial interés para su tratamiento conocer los mecanismos moleculares que controlan la formación del músculo.

Además de existir un alto grado de conservación entre los componentes estructurales que forman el músculo (Steinmetz et al., 2012), los procesos celulares involucrados en su desarrollo también aparecen conservados a lo largo del reino animal (Taylor, 2006). Estas evidencias sugieren la existencia de unos mecanismos moleculares comunes que regulan la miogénesis. Por ello, organismos modelo como el pez cebra, *C. elegans* o *Drosophila melanogaster* son habitualmente utilizados tanto para el estudio de la biología del músculo, como de las bases moleculares responsables de las miopatías (Abmayr and Pavlath, 2012; Ciglar and Furlong, 2009; Demontis et al., 2013a; Maqbool and Jagla, 2007; Sparrow et al., 2008). En esta tesis, se ha empleado *Drosophila* como sistema de estudio de la función del gen *perd* en el tejido muscular. *perd* codifica un proteoglicano transmembrana (*Perd*) ortólogo del receptor de mamíferos NG2, y su función ha sido relacionada previamente con el desarrollo muscular (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Específicamente, *perd* resulta esencial en el proceso de guía hacia el tendón de algunos músculos embrionarios, así como de la formación de la UMT (unión miotendinosa). De manera similar a la musculatura esquelética de vertebrados, en su fase adulta *Drosophila* muestra diferentes tipos de músculos somáticos, los cuales presentan ciertas diferencias específicas a nivel molecular, tanto en su desarrollo como a nivel estructural y fisiológico (Bullard et al., 2005; Burkart et al., 2007; Dutta and VijayRaghavan, 2006). Con el objetivo de estudiar si el requerimiento de *perd* durante la miogénesis está conservado también en la musculatura adulta de *Drosophila*, y analizar en mayor detalle su función, se estudió el desarrollo y

homeostasis del músculo en condiciones de bajos niveles de *Perd*. Para ello, la principal estrategia empleada fue la expresión de ARNi contra el ARNm de *perd*, dirigida específicamente en el tejido muscular mediante el sistema UAS/GAL4/GAL80. Durante la realización de este trabajo, el laboratorio del Dr. Frank Schnorrer publicó un artículo en el que se estudia el desarrollo de la musculatura indirecta del vuelo en condiciones de bajos niveles de *Perd* (Weitkunat et al., 2014). Este estudio será citado a lo largo del texto para discutir distintos aspectos relacionados con los resultados obtenidos en esta tesis.

Perd en la guía del músculo hacia el tendón y en la formación de la UMT

El análisis de la musculatura adulta al final del desarrollo pupal reveló claros defectos en el establecimiento del patrón muscular cuando se expresó *perd* ARNi. Por un lado, los músculos indirectos del vuelo (de tipo fibrilar) aparecieron totalmente desorganizados y formando miosferas, mientras que los músculos dorsales del abdomen (de tipo tubular) aparecieron, aunque con defectos evidentes en su orientación y crecimiento, anclados a la epidermis. No obstante, el incremento de la eficiencia de las líneas ARNi contra *perd* mediante la sobreexpresión de *dicer*, también produjo la aparición de miosferas en los músculos adultos abdominales, indicando que *Perd* se requiere para la correcta formación de la UMT en los diferentes tipos musculares somáticos de *Drosophila*. Este fenotipo ha sido corroborado por Weitkunat y colaboradores, que también observaron la formación de miosferas en la musculatura indirecta del vuelo al expresar *perd* ARNi (Weitkunat et al., 2014). La participación específica de *Perd* en este proceso queda reflejada en su localización, encontrándose en la región del sarcolema que forma parte de la UMT de los músculos adultos abdominales. La localización específica de *Perd* en esta región fue también observada previamente en los músculos embrionarios (Schnorrer et al., 2007).

Además de su función en el desarrollo de la UMT, *Perd* resultó esencial para la migración de los músculos adultos abdominales, que al expresar *perd* ARNi llegaron a aparecer completamente perpendiculares respecto a su orientación silvestre. El análisis in vivo del desarrollo de estos músculos reveló que mientras los músculos del control sufren una reorientación de 90 °C hasta alinearse con el eje antero-posterior del animal, la reducción de

los niveles de *Perd* provocó una ausencia o reducción de este movimiento. Aunque en la miogénesis de la musculatura somática embrionaria no tiene lugar esta reorientación, en mutantes nulos para *perd* se ha descrito la producción de filopodios hacia direcciones erróneas respecto al sitio de anclaje del músculo (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007), reflejando el requerimiento de *Perd* en la orientación de estos músculos hacia las células precursoras del tendón. Otra evidencia que apoya la función de *Perd* en el control de la capacidad migratoria de la célula muscular, es el fenotipo observado cuando se sobreexpresó *Perd* en los músculos adultos, los cuales produjeron extensiones celulares en sus extremos aún cuando ya se habían unido al tendón. En estos músculos, la UMT no se formó correctamente, como se deduce por la observación de algunas miosferas. La producción de filopodios una vez establecida la UMT también se ha descrito en la musculatura embrionaria (Schnorrer et al., 2007), por lo que este fenotipo no es específico de la musculatura adulta abdominal. En conjunto, estos datos demuestran que *Perd* actúa en primer lugar regulando la migración del músculo hacia las células precursoras del tendón, pero además, que una vez que el músculo alcanza el tendón *Perd* podría controlar el final de la migración, activando a otras moléculas involucradas en la formación de la UMT.

Durante la embriogénesis de *Drosophila*, cada músculo muestra un requerimiento diferente para las moléculas que se han identificado en el proceso de guía del músculo hacia los precursores del tendón (Schnorrer and Dickson, 2004), tal y como ocurre con *Perd*, cuya función es especialmente relevante en los músculos VL (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). No obstante, no puede descartarse la existencia de una maquinaria molecular común responsable de este proceso de guía entre los diferentes tipos de músculo. *Perd* podría resultar ser uno de los componentes de esta maquinaria. Por un lado, su función en la guía aparece conservada en la musculatura adulta, pero además, la interacción genética observada con *lanB1* durante la miogénesis embrionaria, indica que *perd* se requiere para el desarrollo de toda la musculatura. Una interacción similar ha sido observada también entre *perd* y *lanB2* (gen codificante de la única cadena gamma de laminina en *Drosophila*) (Wolfstetter and Holz, 2011). Estos resultados muestran que en ausencia de *Perd* o laminina, la mayoría de los músculos embrionarios llegan a unirse por ambos extremos a las células del tendón. Mientras que la falta de función de ambas proteínas resulta en defectos en todo el patrón muscular, formando miosferas la mayor parte de los músculos. Específicamente,

los resultados observados en esta tesis indican que en un fondo mutante para *Perd*, la deficiencia de laminina potencia notablemente los fenotipos de falta de función de *Perd*, tanto en el proceso de guía, como en la formación de una unión estable entre el músculo y el tendón. Por tanto, puede inferirse que *Perd* y laminina participan en estos procesos a nivel general en toda la musculatura embrionaria, formando parte del mismo complejo, o bien actuando de manera paralela o redundante. Por otra parte, a pesar de la naturaleza molecular de *Perd*, que es un proteoglicano transmembrana cuya región extracelular presenta varios dominios putativos de unión a la MEC, no se detectaron fallos de localización de la laminina en la UMT de embriones mutantes nulos para *perd*. *Perd* podría estar uniéndose a otras moléculas de la MEC diferentes, aunque no puede descartarse que forme parte de algún complejo de unión a laminina. Aunque NG2 no ha sido analizado en el contexto de la unión del músculo al tendón, si que se ha descrito su participación en la migración de los axones de las células neuronales, lo que sugiere que su función en el proceso de guía está conservada evolutivamente (Karram et al., 2005).

Tanto durante el proceso de guía de los músculos abdominales hacia las células del tendón, como en la formación de una UMT estable, *perd* mostró interacción genética con integrinas. Este resultado indica que ambos receptores cooperan durante tales procesos, lo que ha sido también descrito durante la miogénesis embrionaria (Estrada et al., 2007). Además, NG2 también coopera con integrinas en procesos de migración celular, proponiéndose que activa rutas de señalización celular dependientes de integrina (Karram et al., 2005). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la interacción entre integrinas y *Perd* en los procesos de migración celular está conservada evolutivamente.

***Perd* en la miofibrillogénesis: especificidad de su función**

Adicionalmente a los fallos descritos en la guía hacia el tendón y en la formación de la UMT, los músculos adultos abdominales que expresaban *perd* *ARNi* mostraron un grosor notablemente menor que en condiciones silvestres. Aunque la ausencia o reducción de eventos de fusión entre mioblastos durante la miogénesis puede causar este fenotipo (Dutta et al., 2004), estos músculos no mostraron tales defectos, presentando un número de

núcleos similar a los músculos silvestres. Otro proceso involucrado en el crecimiento del músculo es la miofibrillogénesis. El ensamblaje del aparato contráctil del músculo estriado, compuesto de miofibrillas, conlleva un incremento del grosor de la célula muscular a lo largo del desarrollo. El reducido grosor observado en los músculos con niveles reducidos de *Perd* resultó ser debido a defectos en este proceso, detectándose una cantidad de miofibrillas claramente menor que en condiciones silvestres. Mientras que normalmente los músculos abdominales diferenciados aparecen recubiertos de miofibrillas alineadas lateralmente entre sí, la expresión de *perd ARNi* conllevó la aparición de espacios entre las miofibrillas. Por un lado la aparición de estos espacios se debió a las pocas miofibrillas ensambladas, que en muchos casos no fueron suficientes para recubrir todo el perímetro de la célula, pero además se observaron fallos en el alineamiento entre las miofibrillas, apareciendo pequeños espacios entre ellas. El resto del sarcoplasma mostró acumulación de proteínas sarcoméricas sin ensamblar, reflejando que aunque el programa de ensamblaje de miofibrillas está activado en la célula, resulta interrumpido.

Durante la miogénesis, tras la unión del músculo al tendón se produce la diferenciación a miofibrilla (Weitkunat et al., 2014), lo que implica el ensamblaje de miofibrillas. Los experimentos realizados con cultivos celulares de *Drosophila* y vertebrados, muestran que para diferenciarse, el músculo necesita anclarse a elementos de la MEC, es decir, formar adhesiones focales (como son la UMT y los costámeros). Específicamente, se ha observado que aunque el músculo se adhiera a una determinada superficie a través de elementos de la MEC (como ocurre in vivo con el tendón), es esencial la formación de adhesiones focales a lo largo del sarcolema, las cuales forman los costámeros. En este sentido, las integrinas han resultado desempeñar un papel esencial. La ausencia de determinados componentes de la MEC en el medio de cultivo, muestra que aunque las integrinas se localizan normalmente en los puntos de contacto entre células, no llegan a acumularse rodeando las bandas Z de las miofibrillas periféricas (costámeros). La ausencia de integrinas en los costámeros coincide con la incapacidad del músculo para formar miofibrillas (Volk et al., 1990). De manera similar, cultivos celulares de músculo esquelético de ratón muestran una clara dependencia entre los costámeros y la miofibrillogénesis. La maduración de ambas estructuras ocurre de manera paralela, y la ausencia de determinados componentes costaméricos que forman parte del complejo dependiente de integrinas, conlleva la ausencia de miofibrillogénesis.

Además, es importante destacar que en estos músculos solo se forman miofibrillas en aquellas regiones donde el sarcolema está en contacto con la MEC (parte basal de las células) (Quach and Rando, 2006). Todos estos resultados son apoyados por evidencias encontradas in vivo. En embriones de *Drosophila* mutantes para integrinas, los músculos llegan a formar algunas miofibrillas, pero su número aparece claramente reducido, y la estructura de los sarcómeros queda notablemente afectada o indiferenciada (Volk et al., 1990). Un fenotipo muy similar es observado en ratones mutantes para la integrina $\beta 1$, cuyos músculos mostraron defectos evidentes en la estructura de las miofibrillas y los costámeros, a pesar de presentar una UMT aparentemente normal (Schwander et al., 2003). En conjunto, estos trabajos apoyan que aunque para iniciar su diferenciación el músculo debe establecer contacto con el tendón, el proceso de miofibrillogénesis es dependiente de la formación de los costámeros, donde las integrinas desempeñan una función esencial y conservada.

En esta tesis, se observó que los músculos adultos del abdomen de *Drosophila* que expresaban *perd* ARNi mostraron una superficie de unión al tendón reducida respecto a los músculos silvestres. No obstante, estos músculos formaron uniones estables con el tendón, no detectándose miosferas salvo cuando se sobreexpresó *dicer*. Esto sugiere que la función de *Perd* en miofibrillogénesis es independiente de su función en la formación de la UMT. De hecho, la expresión del ARNi en fases más avanzadas del desarrollo pupal, en lugar de desde el inicio, resultó en músculos con los mismos defectos en la miofibrillogénesis pero con una UMT de dimensiones similares a la de los músculos silvestres. En esta misma línea apuntan los experimentos de sobreexpresión de *perd*, en los que los músculos ensamblaron una cantidad normal de miofibrillas a pesar de los defectos evidentes que mostraban a nivel de la UMT, llegando a formar miosferas en algunos casos.

Para entender el modo en que *Perd* lleva a cabo su función en la miofibrillogénesis, se analizó su localización en los músculos adultos abdominales. Para ello se emplearon tres aproximaciones: 1. expresión de una copia del gen de *perd* fusionada a la secuencia codificante del péptido HA; 2. Marcaje con anticuerpos específicos; 3. Empleo de una línea transgénica con la secuencia codificante de la proteína GFP en la región génica de *perd*. Estas aproximaciones revelaron la localización específica de *Perd* en distintas regiones del sarcolema. Además de en la UMT como ya se ha mencionado anteriormente, también se

observó en la UNM. Por otro lado, aunque se observó señal de la proteína a lo largo de todo el sarcolema, solo con los métodos 1 y 2 se detectó la acumulación específica de Perd en la zona del costámero. Es importante considerar además, que el ortólogo de Perd en mamíferos, NG2, también localiza en el sarcolema de la musculatura esquelética, y específicamente en la UNM (Petrini et al., 2003). La posible localización de Perd en los costámeros, podría indicar que coopera con las integrinas en la función de estas estructuras durante el proceso de miofibrillogénesis. No obstante, el hecho de que no se detecte señal de Perd específicamente en esta región mediante el método 3, sugiere que Perd podría regular el ensamblaje de miofibrillas desde la UNM o la UMT. Esta última posibilidad es discutida a continuación, mientras que la posible influencia de Perd en la miofibrillogénesis desde la UNM será comentada más adelante.

El trabajo realizado en el laboratorio del Dr. F. Schnorrer (Weitkunat et al., 2014), indica que en los músculos indirectos del vuelo, la reducción drástica de los niveles de Perd produce la formación de miosferas (tal y como se observó en esta tesis), mientras que una reducción más moderada de los niveles produjo músculos parcialmente unidos al tendón. El análisis de estos últimos, reveló defectos en la miofibrillogénesis similares a los observados en los músculos abdominales, detectándose la formación de miofibrillas en la región periférica y la acumulación de elementos sarcoméricos desorganizados en el resto del músculo. Estos defectos en la miofibrillogénesis se reprodujeron mediante cortes con láser a nivel de las células del tendón, o mediante el empleo de líneas mutantes en las que MHC no puede generar contracción muscular, proponiéndose que el requerimiento de Perd en la miofibrillogénesis es debido a la tensión producida gracias a la formación de una UMT estable. En este sentido, se muestra como la reducción de los niveles de Perd provoca la falta de integrinas en los extremos del músculo, reforzando el hecho de que el anclaje al tendón no se forma correctamente. A varios niveles, este trabajo no apoya las observaciones realizadas en esta tesis. Por un lado, tal y como se ha descrito anteriormente, al reducir los niveles de Perd en la musculatura abdominal, no se observó dependencia entre la UMT y el fenotipo de miofibrillogénesis. Además, las integrinas y otras proteínas del mismo complejo como Talin, localizaron normalmente en estos músculos, tanto a nivel de la UMT como del costámero. Una posible explicación para estos fenotipos podría residir en las características específicas de cada tipo de musculatura. Los músculos indirectos del vuelo, al igual que los

músculos esqueléticos de vertebrados son multifibrilares (cada músculo se compone de varias células musculares agrupadas). Sin embargo, a diferencia de lo observado en la mayoría de la musculatura estriada (incluyendo los músculos abdominales de *Drosophila*), las miofibrillas de estos músculos no están alineadas entre sí y su contracción es controlada principalmente por la tensión generada por los movimientos de la cutícula y no por las motoneuronas. De este modo, cada célula muscular es activada de manera asincrónica (Chan and Dickinson, 1996). En base estas características específicas, la miogénesis de estos músculos podría ser especialmente dependiente de la tensión producida en la UMT. De hecho, la importancia de la tensión a nivel de la UMT en estos músculos queda manifestada a nivel estructural en las bandas Z terminales, las cuales establecen la unión al tendón. Estas bandas Z presentan una morfología diferente al resto de las bandas de Z de la miofibrilla, con un grosor drásticamente superior (Fig. R23A y B). Otro hecho relevante en este sentido, es que en los músculos indirectos del vuelo no se observa localización de las integrinas en la región del costámero (Perkins et al., 2010), observándose únicamente en la UMT (Weitkunat et al., 2014). Esto difiere de la localización costamérica descrita para las integrinas en los músculos estriados de diferentes organismos del reino animal, incluyendo el resto de la musculatura somática de *Drosophila* (Labeau-Dimenna et al., 2012; Peter et al., 2011; Ribeiro et al., 2011). En definitiva, esta información sugiere que los músculos indirectos del vuelo podrían presentar importantes diferencias en el proceso de miofibrillogénesis respecto a los músculos abdominales, específicamente en el papel de la UMT en dicho proceso. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten descartar que *Perd* regule el proceso de miofibrillogénesis desde la UMT de manera paralela a la formación de la propia UMT.

***Perd* en la miofibrillogénesis: mecanismos moleculares**

Las miofibrillas que se formaron en músculos con niveles reducidos de *Perd*, mostraron una estructura sarcomérica desorganizada. Mientras que la banda Z no mostró ningún fallo estructural evidente (en base al análisis de proteínas como Zasp o Zormin), se observó que la proteína Kettin, que en condiciones silvestres se extiende desde la banda Z hasta los filamentos de miosina (Bullard et al., 2005), quedaba restringida únicamente a la banda Z

cuando se expresaba *perd ARNi*. Además, se observó que tanto los filamentos de actina como los de miosina, aparecían de manera continua entre las bandas Z a lo largo de todo el sarcómero. El empleo de condiciones de relajación de los sarcómeros, permitió observar que esta organización anómala de la actina no era debida a un estado conformacional contraído de los sarcómeros, sino que existían defectos estructurales. De hecho, se observó que los sarcómeros formados en condiciones de bajos niveles de *Perd*, eran significativamente más cortos que en condiciones silvestres. Este resultado es corroborado por el trabajo del grupo del Dr. F. Schnorrer (Weitkunat et al., 2014), donde también se observó una clara reducción del tamaño de los sarcómeros de los músculos indirectos del vuelo al expresar *perd ARNi*. En este caso, el fenotipo observado es similar al de los músculos silvestres en fases tempranas de la miofibrillogénesis, proponiéndose que a bajos niveles de *Perd* las pocas miofibrillas formadas no llegan a diferenciar por completo su estructura. Tanto en vertebrados (Sanger et al., 2009) como en *Drosophila* (Reedy and Beall, 1993a), se ha observado que antes de alcanzar su estructura madura o diferenciada, las miofibrillas muestran filamentos de actina y miosina de manera continua entre las bandas Z. Posteriormente los sarcómeros incrementan su tamaño y los filamentos delgados y gruesos se organizan normalmente, observándose la zona H y las bandas A (Fig. 4). En este proceso de crecimiento del sarcómero e interdigitación de los filamentos de actina y miosina, se considera esencial el papel de la proteína Titina (ortólogo en vertebrados de kettin) (Sparrow and Schöck, 2009). En este sentido, el fenotipo observado en esta tesis en los músculos dorsales abdominales con bajos niveles de *Perd*, se asemeja notablemente a la estructura descrita para los estadios tempranos de las miofibrillas durante el desarrollo. Esta semejanza queda reflejada en varias observaciones: ausencia o reducción de zona H, ausencia de organización de MHC, localización de kettin restringida a la banda Z, y acumulación de proteínas sarcoméricas sin ensamblar en el sarcoplasma. Además, el hecho de encontrar algunos músculos con niveles reducidos de *Perd* que llegan a formar miofibrillas con distribución de la actina y longitud sarcomérica similar al silvestre, indica que los defectos estructurales del sarcómero habitualmente observados en estos músculos, no son la causa del reducido ensamblaje de miofibrillas. En este sentido, se ha descrito que mutaciones en diferentes componentes estructurales del sarcómero implican la formación de músculos capaces de ensamblar miofibrillas pero con una estructura anómala y/o no funcional (Beall et al., 1989). Considerando además que *Perd* no localiza en el sarcómero, su

función en la miofibrillogénesis podría estar relacionada con la regulación de rutas de señalización de la diferenciación muscular, o bien permitiendo a nivel estructural la maduración o correcto posicionamiento de las miofibrillas. Estas dos posibilidades son discutidas a continuación.

Como se ha mencionado anteriormente, las integrinas desempeñan una función esencial durante la miofibrillogénesis. El modelo de premiofibrilla (Rhee et al., 1994; Sparrow and Schöck, 2009) (Fig. 5) propone que los sitios de adhesión de integrinas (principalmente los costámeros), actúan como puntos de nucleación sobre los que se empiezan a ensamblar los componentes sarcoméricos. Además, se propone que el anclaje de las bandas Z de las miofibrillas a los costámeros permite, en base a fuerzas de contracción, la correcta interdigitación y maduración de las miofibrillas (Quach and Rando, 2006). El otro modelo principal existente que explica la miofibrillogénesis, el modelo de ensamblaje independiente (Holtzer et al., 1997) (Fig. 5), no considera que la miofibrillogénesis se inicie en los costámeros, pero también atribuye a estas estructuras un papel esencial en el correcto alineamiento de los elementos del sarcómero (Rui et al., 2010). Por tanto, existe bastante consenso en la comunidad científica en cuanto al papel de los costámeros en el proceso de maduración de las miofibrillas. Tal y como ya se ha descrito, en algunos contextos la falta de función de integrinas conlleva la ausencia de miofibrillas. No obstante, en función de la mutación y/o el sistema utilizado llegan a formarse algunas miofibrillas con diferentes fenotipos. Mientras los casos más graves muestran la ausencia completa de miofibrillas (Volk et al., 1990), en la mayoría de los casos descritos llegan a formarse miofibrillas pero con una estructura altamente desorganizada, incluyendo a las bandas Z (Schwander et al., 2003; Volk et al., 1990). Por otro lado, los fenotipos menos severos muestran miofibrillas con una estructura sarcomérica similar a la del silvestre a excepción de la región central, no pudiendo identificarse la zona H y/o la banda M (Bloor and Brown, 1998; Schwander et al., 2003). Estos fenotipos se asemejan en gran medida a lo observado en esta tesis en los músculos dorsales del abdomen de *Drosophila* cuando se redujeron los niveles de Perd. Considerando además la posible localización de Perd que se detectó en los costámeros de estos músculos Perd podría, de manera similar a integrinas, actuar en la miofibrillogénesis desde los costámeros, en paralelo o formando parte del mismo complejo. A pesar de la drástica reducción en la cantidad de miofibrillas ensambladas, la expresión de *perd* ARNi no

anuló por completo la formación de miofibrillas en los músculos abdominales adultos de *Drosophila*. Considerando que los niveles de ARNm de *perd* no se redujeron por completo, los resultados obtenidos no permiten inferir si *Perd* desempeña una función esencial en la iniciación de la miofibrillogénesis, como se ha descrito para integrinas (Volk et al., 1990), o si bien se requiere posteriormente durante este proceso.

La expresión de una construcción ARNi específica contra el ARNm de *mys* (gen codificante de la subunidad beta de la integrina en *Drosophila*), no produjo diferencias evidentes en la cantidad de miofibrillas de los músculos dorsales del abdomen respecto a la condición silvestre, sugiriendo que la reducción de los niveles de integrina fue suficiente para permitir la miofibrillogénesis pero no para mantener la UMT. Debido a que gran parte de la musculatura ya formó miosferas en estas condiciones, no pudo analizarse el fenotipo de integrinas en la miofibrillogénesis de estos músculos mediante incremento de la eficiencia del ARNi. De hecho, la expresión conjunta de *mys ARNi* y el ARNi menos eficiente contra *perd* (la línea JF01159) produjo que toda la musculatura formara miosferas, imposibilitando el análisis de la estructura de los músculos. En este sentido, sería recomendable la utilización de otra línea ARNi menos efectiva o de un alelo hipomorfo de *mys*, a fin de que los músculos se mantuviesen unidos al tendón y así poder analizar la interacción entre *perd* e integrinas en la miofibrillogénesis.

Aunque en el trabajo de Weitkunat y colaboradores (Weitkunat et al., 2014) la expresión de *perd ARNi* resultó en la ausencia de integrinas en los extremos de los músculos indirectos del vuelo, en esta tesis, como ya se ha comentado, no se observaron diferencias en los niveles de integrinas en la UMT y en los costámeros de los músculos dorsales del abdomen que expresaban *perd ARNi* respecto a la condición silvestre. De hecho, Talin, una proteína involucrada en la activación del complejo intracelular de integrina (Critchley and Gingras, 2008; Wang, 2012) y esencial para la función de integrina en la UMT de los músculos embrionarios de *Drosophila* (Bökel and Brown, 2002), también localizó normalmente. Estos resultados sugieren que la reducción de los niveles de *Perd* produce defectos en la miofibrillogénesis de manera independiente a la función de las integrinas. No obstante, debido a que el complejo de adhesión dependiente de integrina puede regular directa o indirectamente múltiples moléculas a nivel intracelular, no puede descartarse por completo

que la ruta de señalización de las integrinas esté afectada en algún punto en estos músculos.

En cuanto a la posibilidad de que *Perd* regule el ensamblaje de las miofibrillas participando en alguna ruta de señalización, resulta de especial relevancia el análisis preliminar realizado con las proteínas PDZ candidatas a interaccionar con *Perd*. Uno de los candidatos identificados fue la proteína RhoGEF2. La expresión de *rhoGEF2 ARNi* durante el desarrollo pupal, no afectó al establecimiento del patrón de los músculos dorsales del abdomen, que aparecieron correctamente orientados y distribuidos a lo largo de los hemisegmentos. Además de mostrar una morfología y superficie de unión al tendón similar a la de los músculos silvestres. Sin embargo, estos músculos que expresaron *rhoGEF2 ARNi*, eran extremadamente delgados, mostrando una cantidad de miofibrillas notablemente reducida respecto a la condición silvestre. En general, el fenotipo de estos músculos fue muy similar al observado cuando *perd ARNi* se expresó una vez establecido el patrón de la musculatura abdominal. Dado que el dominio PDZ de RhoGEF2 reúne las características estructurales para unirse al extremo carboxilo terminal de *Perd*, este resultado sugiere que podría interaccionar con *Perd* durante el proceso de miofibrillogénesis. RhoGEF2 es un activador de la RhoGTPasa RhoA, y está implicado en el ensamblaje de los filamentos de actina y en el control de la contracción del complejo actina-miosina durante la morfogénesis epitelial embrionaria (Grosshans et al., 2005; Padash Barmchi et al., 2005; Simões et al., 2006). Por un lado, se ha observado que durante la migración de las células de la glía, NG2 (ortólogo de *Perd* en mamíferos) regula el citoesqueleto de actina activando a las RhoGTPasas Cdc42 y Rac (Eisenmann et al., 1999; Majumdar et al., 2003), lo que indica la capacidad de NG2 de regular rutas de señalización dependientes de RhoGTPasas. Por otra parte, en el contexto de la diferenciación de las células musculares, se ha descrito que la formación de las miofibrillas de la musculatura embrionaria somática de *Drosophila* es independiente de RhoA (Bloor and Kiehart, 2001). No obstante, también se ha demostrado que la inactivación de RhoA, o de Rock (uno de los efectores activado por RhoA) en cardiomiocitos de pollo inhibe la miofibrillogénesis (Sakata et al., 2007; Wang et al., 1997). En concordancia con estos resultados, se ha observado que la actividad de RhoA controla la miofibrillogénesis en cardiomiocitos de rata (Hoshijima et al., 1998). Finalmente, ya que las fuerzas contráctiles resultan esenciales para la maduración de las miofibrillas (Sparrow and

Schöck, 2009), el hecho de que RhoGEF2 regule rutas de señalización que controlan la contractibilidad del complejo actina-miosina, sugiere un mecanismo por el que *Perd* podría regular la tensión en el interior del músculo. En el caso de los músculos indirectos del vuelo esta tensión sería transmitida exclusivamente desde la UMT (Weitkunat et al., 2014), mientras que en los músculos abdominales también desde lo sería desde los costámeros. Considerando toda esta información y los resultados obtenidos en esta tesis, RhoGEF2 resulta un candidato de gran interés para estudiar el mecanismo molecular responsable de la función de *Perd* durante la miofibrillogénesis.

***Perd* en el desarrollo de la UNM, y papel de la UNM en la miofibrillogénesis**

Dado que se detectó la localización específica de *Perd* en la UNM, se decidió estudiar el requerimiento de *Perd* para el desarrollo de esta región. De este modo, se observó que la expresión de *perd* *ARNi* en la musculatura durante el desarrollo pupal, no solo produjo defectos en la formación de los propios músculos, sino también en la diferenciación de su innervación. Las motoneuronas de los músculos con bajos niveles de *Perd* mostraron pocos terminales sinápticos y de morfología anómala respecto a la condición silvestre, lo que sugiere que la funcionalidad de la innervación de estos músculos está afectada.

La importancia de la UNM en la diferenciación del tejido muscular ha sido demostrada en ciertos tipos musculares (Condon et al., 1990; Currie and Bate, 1995; Fernandes and Keshishian, 1998; Hoh, 1991), mientras que en otros casos, los músculos se desarrollan normalmente en ausencia de innervación (Broadie and Bate, 1993; Harris, 1981; Hoh, 1991). Para estudiar si el requerimiento de *Perd* en el ensamblaje de las miofibrillas, estaba relacionado con su función en la UNM, en esta tesis se decidió estudiar la influencia de la funcionalidad de esta región en la miofibrillogénesis. Para ello, se emplearon condiciones de inhibición de la estimulación eléctrica mediante la sobreexpresión de canales de potasio en los músculos, y de inhibición de la transmisión sináptica mediante la expresión de la toxina tetánica en las motoneuronas (White et al., 2001b). Aunque en ambos casos se vio afectada la capacidad de locomoción de los animales, ninguna de estas aproximaciones evidenció cambios en la capacidad de ensamblaje de miofibrillas respecto a la condición silvestre. Por

tanto, parece que el desarrollo de estos músculos es independiente de la actividad neuronal. No obstante, resulta de especial relevancia considerar el trabajo realizado por el laboratorio del Dr. M. Bate (Currie and Bate, 1995), en el que se analizó la miogénesis de estos mismos músculos (músculos adultos dorsales abdominales) en hemisegmentos donde se cortaron los nervios. Estos músculos denervados mostraron un grosor notablemente inferior respecto a aquellos que mantuvieron la innervación. Aunque se detectó una reducción del número de mioblastos que formaban cada músculo denervado, se observó que algunos de estos músculos tenían un número de núcleos similar a los músculos silvestres, presentando también un grosor significativamente reducido. Por tanto, además de al proceso de fusión, la ausencia de nervio produce defectos en el crecimiento de estos músculos. En lo que respecta a los resultados observados en esta tesis, no puede descartarse que a pesar de los métodos inhibitorios empleados, aún persista cierta actividad sináptica que sea suficiente para permitir que la miofibrillogénesis suceda de manera correcta. No obstante, el hecho de que no se observaran diferencias en el tamaño de estos músculos respecto a la condición silvestre, sugiere que la actividad sináptica no es necesaria para su diferenciación. Por tanto, los datos obtenidos por el grupo del Dr. M. Bate (Currie and Bate, 1995), indican que los nervios proporcionan algún tipo de señal necesaria para el crecimiento de estos músculos. En este sentido, se ha observado que aunque la actividad sináptica se requiere para la miofibrillogénesis durante el desarrollo y la regeneración de algunos músculos (Boncompagni et al., 2007; Fujita et al., 2007), en otros casos se ha observado requerimiento de innervación pero no de estimulación eléctrica (Condon et al., 1990; Hoh, 1991). Este tipo de influencia del nervio sobre la diferenciación del músculo es atribuida a la producción de factores tróficos (Edgerton et al., 2002). Aunque no puede descartarse que *Perd* esté involucrado en la recepción de estos factores tróficos, los resultados obtenidos sugieren que su función en la UNM no está relacionada con su requerimiento en miofibrillogénesis.

El desarrollo de la UMT requiere de la interacción entre el músculo y la motoneurona. De hecho, la maduración y ramificación de la UNM es un proceso acoplado al crecimiento del músculo. Esto ha sido descrito tanto en *Drosophila* (Miller et al., 2012) como en vertebrados (Sanes and Lichtman, 2001). Considerando que la expresión de *perd* *ARNi* produce músculos con un crecimiento limitado, es difícil establecer si los defectos observados en la UNM de

estos músculos es el resultado de la función de *Perd* en el desarrollo de dicha estructura, o bien una consecuencia del escaso crecimiento de la célula muscular. En este sentido, sería interesante estudiar la UNM de los músculos silvestres en etapas más tempranas del desarrollo pupal ($\approx 50h$ APF), cuyo tamaño fue similar al observado para los músculos con bajos niveles de *perd* al final del desarrollo ($\approx 100h$ APF). De este modo, podría identificarse si el fenotipo observado en la UNM es debido al tamaño de las fibras. Las integrinas son requeridas específicamente durante para el desarrollo de la UNM (Burkin et al., 2000; Martin et al., 1996), por lo que otra aproximación para discernir si el correcto desarrollo de esta región es esencial para la miofibrillogénesis, sería analizar la UNM en condiciones de niveles reducidos de integrinas.

A nivel molecular, la interacción de *Perd* con GRIP ha sido demostrada a nivel bioquímico y genético (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). Esta interacción está conservada evolutivamente, habiéndose descrito también la interacción entre NG2 y GRIP (Trotter et al., 2010). El interés de esta información reside en que GRIP es un componente esencial en el desarrollo de la UNM. De hecho, su falta de función conlleva la aparición de botones o terminales sinápticos de morfología aberrante y número reducido (Ataman et al., 2006). Con el objetivo de testar si la ruta de señalización regulada por *Perd* a través de GRIP estaba relacionada con el proceso de miofibrillogénesis, se analizó la función de GRIP en el desarrollo de los músculos dorsales del abdomen. La expresión de *GRIP ARNi* durante el desarrollo pupal produjo fallos en la capacidad de locomoción de los animales, que en la mayoría de los casos no llegaron a eclosionar de la pupa. Sin embargo, no se observó ningún defecto evidente en la miofibrillogénesis de los músculos abdominales. Estos datos sugieren que o bien la función de *Perd* en este contexto no es dependiente de GRIP, o que directamente la función de *Perd* en la UNM no influye en la miofibrillogénesis de estos músculos.

***Perd* en la homeostasis del tejido muscular**

Además del análisis detallado del requerimiento de *Perd* durante la miogénesis de la musculatura adulta de *Drosophila*, en esta tesis se inició el estudio de la función de *Perd*

durante el mantenimiento de dicha musculatura. En este sentido, la primera observación fue que los músculos persistentes larvarios (que pasan a formar parte del patrón muscular adulto) formaron miosferas cuando se redujeron los niveles de *Perd* durante el desarrollo pupal. Considerando que estos músculos ya estaban presentes antes de iniciar la expresión del ARNi contra el ARNm de *perd*, esto podría sugerir que *Perd* se requiere para el mantenimiento de la UMT. Es importante resaltar, sin embargo, que estos músculos larvarios sufren una remodelación de su estructura durante el desarrollo pupal (Ribeiro et al., 2011), y que las células de la epidermis a las que se unen son sustituidas, por lo que posiblemente la función de *Perd* en este contexto esté relacionada con la formación de una nueva UMT y no con el mantenimiento de este anclaje.

Por otro lado, la expresión de *perd* ARNi a partir de la eclosión de la pupa, permitió reducir los niveles de *Perd* una vez finalizado el desarrollo muscular. Mediante ensayos de escalada, se observó que estos animales mostraban una capacidad de locomoción reducida respecto a los organismos silvestres. Este resultado ha sido corroborado recientemente por el laboratorio del Dr. Guy Tanentzapf (Perkins and Tanentzapf, 2014). No obstante, el análisis por microscopía confocal de diferentes marcadores sarcoméricos en los músculos torácicos, abdominales y de la pata de estos animales, no reveló ningún defecto estructural. En este sentido, solo se observó mediante microscopía electrónica el desgarro de los filamentos de actina de la banda Z terminal de los músculos indirectos del vuelo, así como la desorganización del citoesqueleto de las células del tendón a las que estos músculos estaban unidos. Fenotipos similares se observaron en la capacidad de escalada y en la estructura de los músculos indirectos del vuelo cuando se redujeron los niveles de integrinas mediante la expresión de *mys* ARNi. En concordancia con estas observaciones, previamente se han descrito fenotipos de desorganización progresiva de la estructura de la UMT en mutantes para integrinas tanto en *Drosophila* (Perkins et al., 2010) como en mamíferos (Mayer et al., 1997). Estos datos sugieren que *Perd*, de manera similar a integrinas, se requiere para soportar el estrés mecánico a nivel de la UMT. Sin embargo, es posible que los defectos observados en la capacidad de locomoción de los animales con niveles reducidos de *Perd* sean debidos, al menos en parte, a otros defectos adicionales. En el caso de integrinas, también se ha descrito su requerimiento en la homeostasis de la estructura y función de la UNM (Burkin et al., 2001; Martin et al., 1996). En este sentido,

considerando la localización de Perd en la UNM y la importancia de esta estructura durante la homeostasis del tejido muscular (Beramendi et al., 2007; Rahimov and Kunkel, 2013; Wairkar et al., 2008), sería interesante analizar el estado de la UNM de la musculatura de las moscas con niveles reducidos de Perd.

En lo referido al ortólogo de Perd en mamíferos, se ha observado que tras el desarrollo de la musculatura esquelética, NG2 sigue apareciendo localizado en el sarcolema de la musculatura de humanos (incluyendo la UNM), aunque sus niveles van decreciendo con la edad, sugiriendo que su requerimiento se reduce. De hecho, los niveles de NG2 son especialmente altos en miofibras que sufren regeneración (Petrini et al., 2003). Estos datos sugieren que este proteoglicano es necesario para la miogénesis. Pero además, es de especial relevancia considerar que los niveles de NG2 en el sarcolema de la musculatura esquelética madura, disminuyen significativamente más en condiciones de distrofia muscular de Ulrich (Higashi et al., 2006) o de distrofia muscular congénita por déficit de merosina que en músculos silvestres, mientras que se incrementan en condiciones de distrofia muscular de Duchenne (Petrini et al., 2003). Estas alteraciones de los niveles de NG2 en diferentes miopatías resaltan su participación en el mantenimiento de la estructura muscular. Inicialmente, sería interesante analizar si los niveles de Perd en la musculatura adulta de *Drosophila* también van descendiendo con la edad en condiciones silvestres. Aunque es posible que la vida de *Drosophila* no sea lo suficientemente larga como para apreciar estos cambios, considerando que en humanos los descensos de los niveles de NG2 en el sarcolema comienzan a apreciarse a partir de los 4-5 años de edad (Petrini et al., 2003). Mientras que en mamíferos los músculos dañados pueden ser reparados por las células satélite, teniendo lugar eventos de miogénesis durante la etapa adulta (Hawke and Garry, 2001), en *Drosophila* no se ha identificado ningún tipo de célula progenitora muscular durante la etapa adulta. Además, la ausencia de actividad muscular no parece afectar a la morfología de la musculatura adulta de *Drosophila* (Piccirillo et al., 2014). Por tanto, el requerimiento de Perd que se observó durante la homeostasis de estos músculos debe estar relacionado con el mantenimiento de la estructura muscular y no con la regeneración de las miofibras. Esto es apoyado por los defectos detectados en UMT de los músculos indirectos del vuelo en condiciones de bajos niveles de Perd.

Los niveles de NG2 varían de manera similar a los de integrinas en los distintos tipos de distrofias analizadas (Hodges et al., 1997; Petrini et al., 2003; Vachon et al., 1997), por lo que una vez más se infiere que ambos receptores transmembrana podrían funcionar de manera paralela o redundante en los mismos procesos. De hecho, las integrinas aparecen especialmente concentradas en la UMT, UNM y los costámeros de miofibras maduras (Rahimov and Kunkel, 2013). La función de las integrinas en el mantenimiento de la estructura muscular está principalmente relacionada con su función de anclaje del citoesqueleto muscular a la MEC (Kanagawa and Toda, 2006), siendo el colágeno VI y la laminina dos de sus ligandos extracelulares mejor conocidos (Thorsteinsdóttir et al., 2011). En el caso de NG2, se ha descrito que la ausencia de colágeno VI conlleva una disminución de los niveles de NG2 específicamente en el sarcolema de la musculatura esquelética (Higashi et al., 2006; Petrini et al., 2005). En la misma línea, la ausencia de la laminina alfa 2 produce una reducción de los niveles de NG2 (Petrini et al., 2003). Finalmente, también se ha descrito que la sobreexpresión de NG2 en células hepáticas produce un incremento de colágeno VI y laminina en la MEC circundante (Xiong et al., 2007). Toda esta información indica que NG2 participa en el anclaje celular a la MEC, habiéndose descrito la interacción directa entre NG2 y colágeno VI (Tillet et al., 1997). Considerando además la interacción genética entre *perd* y *lanB1* durante la miogénesis embrionaria (observada en esta tesis), sería de gran interés estudiar la relación de *Perd* con la MEC durante la homeostasis de la musculatura adulta de *Drosophila*, lo cual podría ayudar a comprender el modo en que *Perd* se requiere durante dicho proceso.

Observaciones conclusivas

El trabajo realizado durante la presente tesis doctoral, identifica por primera vez que el proteoglicano transmembrana *Perd* se requiere de manera específica para la miofibrillogénesis. Además, se ha observado que su función en la guía del músculo al tendón y en la formación de la UMT está conservada en la musculatura adulta de *Drosophila*, requiriéndose también para el desarrollo de la UNM y el mantenimiento del tejido muscular. *Perd* e integrinas colocalizan y están involucrados en los mismos procesos celulares durante la miogénesis y la homeostasis del tejido muscular. En esta línea, el ortólogo de *Perd* en

mamíferos, NG2, ha mostrado un comportamiento análogo al de integrinas en diferentes distrofias (Petrini et al., 2003). Considerando esta información y trabajos como el realizado por el laboratorio del Dr. Stephen Kaufman (Burkin et al., 2001), donde se describe que la sobreexpresión de integrinas reduce significativamente los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne en ratón, Perd resulta un candidato de especial interés no solo para conocer mejor la biología del músculo, sino también para el desarrollo de nuevas terapias contra ciertas distrofias musculares. Para ello, será fundamental identificar los mecanismos moleculares que regulan su función.

Conclusiones

1. La disminución de los niveles de *Perd* no afecta a los procesos de especificación y fusión de mioblastos de la musculatura adulta dorsal del abdomen.
2. *Perd* desempeña un papel esencial en la migración de los músculos adultos dorsales del abdomen, siendo requerido para la segregación de estos músculos y para su correcta orientación.
3. *Perd* se requiere para la unión de la musculatura adulta somática a las células del tendón (UMT), tanto en los músculos de tipo fibrilar como los de tipo tubular.
4. *Perd* se requiere para el proceso de miofibrillogénesis. Este requerimiento es adicional a las funciones de *Perd* en los procesos de guía del músculo hacia el tendón y de la formación de la UMT.
5. Las miofibrillas de los músculos dorsales del abdomen en condiciones de bajos niveles de *Perd*, presentan una estructura sarcomérica indiferenciada, donde se acumulan de manera anómala componentes sarcoméricos no ensamblados en su sarcoplasma.
6. *perd* y *mys* (subunidad β PS de la integrina) interaccionan genéticamente durante la miogénesis de los músculos adultos dorsales del abdomen. Específicamente, en la guía del músculo hacia el tendón y en la formación de la UMT.
7. La función de *Perd* en el proceso de miofibrillogénesis, resulta independiente de la formación de los complejos de adhesión de integrinas en los costámeros y la UMT.
8. El desarrollo de la UNM aparece afectado en músculos con bajos niveles de *Perd*, observándose fallos en el número de terminales sinápticos y en la morfología de los mismos.
9. Resultados preliminares sugieren que la actividad sináptica de la UNM no es esencial para el proceso de miofibrillogénesis de los músculos adultos dorsales del abdomen.

CONCLUSIONES

10. RhoGEF2, proteína con dominio PDZ, candidata a interaccionar con la región intracelular de Perd, se requiere para el proceso de miofibrillogénesis de los músculos adultos dorsales del abdomen.

11. *perd* y *lanB1* interaccionan genéticamente en la orientación de las extensiones celulares del miotubo hacia las células precursoras del tendón, y en el establecimiento de la unión con estas células.

12. Perd no es esencial para la localización de laminina en la UMT de la musculatura somática embrionaria.

13. Perd, de manera similar su ortólogo en mamíferos NG2, se localiza en el sarcolema de las miofibras adultas, concentrándose específicamente en las regiones de la UMT y la UNM.

14. La disminución de los niveles de Perd tras el desarrollo del tejido muscular, acelera la pérdida de la capacidad locomotora del animal a lo largo del tiempo. Estos animales presentan defectos en el mantenimiento de la UMT de los músculos indirectos del vuelo, similares a los observados al reducir los niveles de integrina β PS.

Material y métodos

Genética

- **Cepas de *Drosophila melanogaster***

En este trabajo se usaron diferentes stocks a partir de los cuales, mediante cruces, se obtuvieron los diferentes genotipos analizados. Las líneas empleadas fueron las siguientes:

Línea	Procedencia
<i>yw</i>	Bloomington Stock Center
<i>w ; sp / CyO, FLacZ ; Dr / TM3, FLacZ</i>	Bloomington Stock Center
<i>w ; tub-GAL80ts</i>	Bloomington Stock Center (7108)
<i>yw ; ; Mef2-GAL4</i>	Bloomington Stock Center (27390)
<i>yw, 1151-GAL4</i>	Dr. K. VijayRaghavan (Roy and VijayRaghavan, 1997)
<i>w ; VGlut-GAL4</i>	Bloomington Stock Center (26160)
<i>yw ; ; UAS-mCD8::GFP</i>	Bloomington Stock Center (5130)
<i>w ; ; UAS-dicer</i>	Bloomington Stock Center (24651)
<i>yv ; ; UAS-perd ARNi JF01159</i>	Bloomington Stock Center (31584)
<i>w ; ; UAS-perd ARNi 106680</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (106680)
<i>w ; UAS-mys ARNi</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (29619)
<i>w ; UAS-rhea ARNi / (CyO)</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (40400)
<i>w ; UAS-Zasp52 ARNi</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (106177)
<i>w ; ; UAS-CG31772 ARNi</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (25846)
<i>w ; UAS-dlg5 ARNi</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (101596)
<i>w ; UAS-X11LB ARNi</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (110126)
<i>w ; UAS-GRIP ARNi / CyO</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (21003)
<i>w ; UAS-rhoGEF2 ARNi / (CyO)</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (110577)
<i>w ; UAS-CG6688 ARNi</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (106372)
<i>w ; UAS-cno ARNi</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (102686)
<i>w ; ; UAS-scrib ARNi</i>	Dra. S. Sotillos (sin publicar)

<i>UAS-perd::HA (III)</i>	Dr. F. Schnorrer (Schnorrer et al., 2007)
<i>yw ; ; UAS-rhea::mCherry / TM6B</i>	Dr. H. Bellen (Venken et al., 2011)
<i>w ; UAS-TeTxLC(G)</i>	Bloomington Stock Center (28838)
<i>w ; UAS-Kir2.1</i>	Bloomington Stock Center (6596)
<i>w ; ; Zasp::GFP</i>	Kyoto Stock Center (110740)
<i>w ; ; sls::GFP</i>	Kyoto Stock Center (110855)
<i>w ; perd::GFP(9) / CyO</i>	Dra. B. Estrada (sin publicar)
<i>w ; perd^{F1-3} / CyO, FLacZ</i>	Dra. B. Estrada (Estrada et al., 2007)
<i>w ; perd^{L87} / CyO, FLacZ</i>	Dra. B. Estrada (Estrada et al., 2007)
<i>w ; lanB1^{DEF} / CyO, actina::GFP</i>	Dra. M. D. Martín Bermudo (Urbano et al., 2009)
<i>w ; lanB1^{1P3} / CyO, actina::GFP</i>	Dra. M. D. Martín Bermudo (Urbano et al., 2009)
<i>5053-GAL4, UAS-mCD8::GFP / TM3, FLacZ</i>	Dra. A. Chiva (Ritzenthaler et al., 2000)

• Generación de cromosomas recombinantes

Para analizar el efecto simultáneo que producen determinados alelos de distintos genes localizados en el mismo cromosoma, es posible generar un cromosoma recombinante que lleve simultáneamente dichos alelos. Para ello, se utiliza el mecanismo natural de recombinación meiótica que tiene lugar en las hembras de *Drosophila*. Estos eventos son normalmente bloqueados mediante el empleo de cromosomas balanceadores (cromosomas con múltiples inversiones y mutaciones) (Roote and Prokop, 2013). A partir del mapa citogénético de los cromosomas y las frecuencias de recombinación observadas para cada posición, se ha generado un mapa que permite estimar la probabilidad de que tenga lugar la recombinación entre dos *loci* determinados (St Pierre et al., 2014). En este trabajo, se generaron dos cromosomas recombinantes. La estrategia seguida en cada caso se describe a continuación:

Generación del cromosoma 2 *lanB1*^{DEF}, *perd*^{F1-3}

Los genes *perd* y *lanB1* localizan en el brazo izquierdo del cromosoma 2 de *Drosophila*. La posición citogenética del locus de *perd* es 36F5 (posición 53,9 en el mapa genético), y *lanB1* está localizado en la posición 28C4 (posición 28 en el mapa genético). Por tanto, la distancia genética entre ambos *loci* es de 25,9 unidades, lo que significa que la frecuencia de recombinación entre ambos *loci* es del 25,9 %. Considerando que en cada evento de recombinación se generan 2 cromosomas diferentes, esta frecuencia implica una probabilidad de obtener un cromosoma de cada 7,72 con la recombinación deseada. Estos valores dieron una idea aproximada del número de individuos que hubo que testar para, por probabilidad, obtener alguno con el cromosoma de interés (portando ambos alelos) (ver procedimiento a continuación).

Mediante el cruce de individuos con los alelos *perd*^{F1-3} (Estrada et al., 2007) y *lanB1*^{DEF} (Urbano et al., 2009) (ver apartado cepas) (Fig. 39A), se obtuvieron hembras con ambos cromosomas. La ausencia de balanceador, permite que durante la meiosis sucedan eventos de recombinación homóloga entre ambos cromosomas. Para aislar los posibles cromosomas recombinantes, se cruzaron las hembras en cuestión con machos balanceados (Fig. 39B). Posteriormente, para testar cual de los individuos de esta descendencia portaba un cromosoma recombinante con los dos alelos de interés, cada macho se cruzó de forma paralela con otro alelos o deficiencias que afectaban a los genes de interés. Concretamente con las líneas *perd*¹⁸⁷ (alelo nulo de *perd*) (Estrada et al., 2007) y *lanB1*^{1P3} (alelo nulo de *lanB1*) (Urbano et al., 2009). Solo aquellos cromosomas recombinantes con ambos alelos, producirán letalidad en ambos cruces en ausencia de balanceador (Fig. 39C). En dicho caso, se aislaron individuos de ambos sexos con un determinado balanceador para establecer la

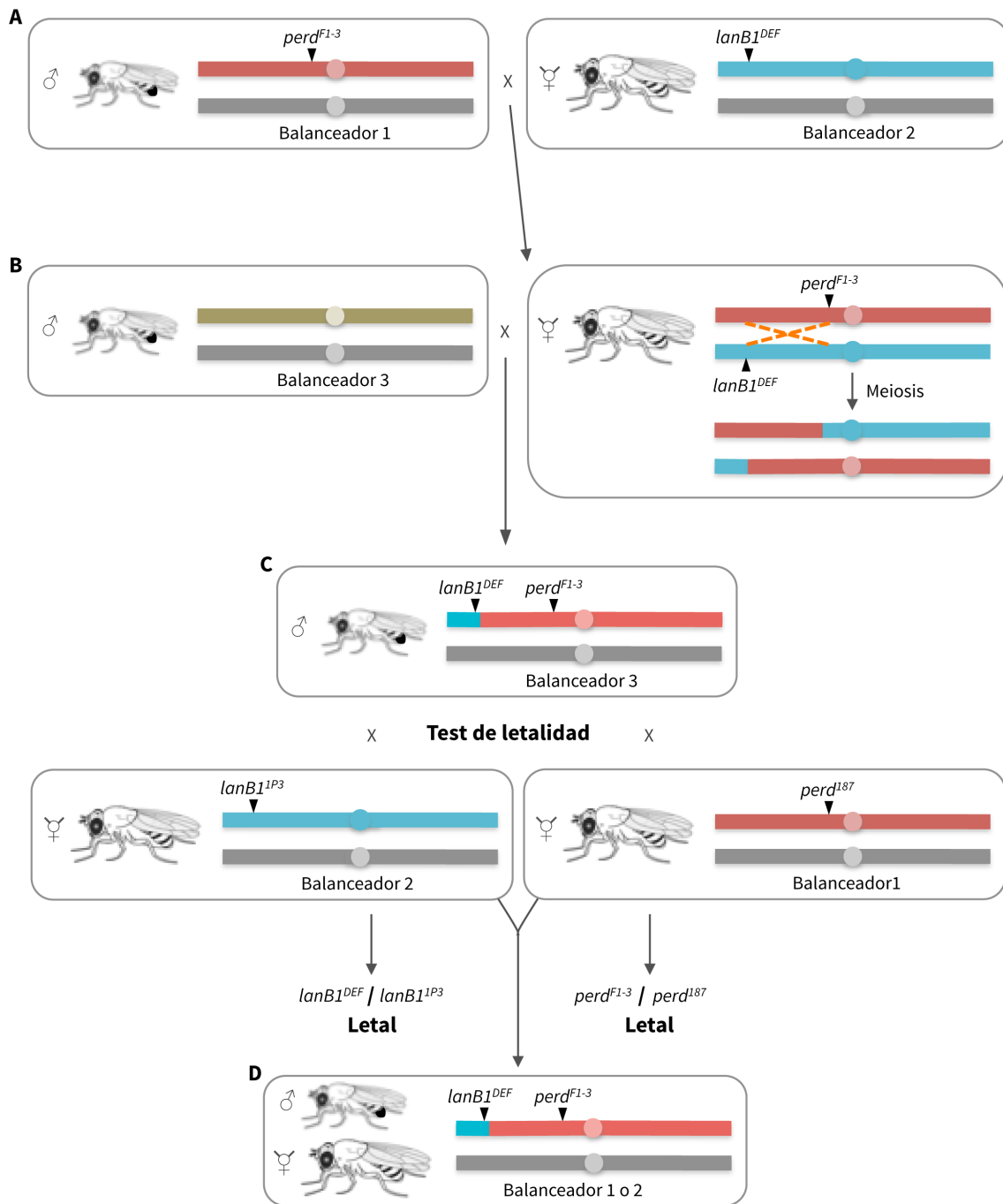


Figura 39

Procedimiento empleado para la obtención del cromosoma 2 *lanB1^{DEF}*, *perd^{F1-3}*. (A) Cruce entre individuos que portan los alelos de interés. Se representan los dos cromosomas homólogos del cromosoma 2 de cada animal. (B) Aquellas hembras de la progenie que heredan los cromosomas con los alelos de interés, se cruzan con machos balanceados para recoger los diferentes cromosomas generados tras los eventos de recombinación meiótica. (C) Machos de esta progenie se cruzan con cada una de las líneas de partida. (D) La descendencia de aquellos cruces en los que la ausencia de balanceador produce letalidad, fueron establecidos como líneas recombinantes.

línea recombinante (Fig. 39D). De este modo, se obtuvieron dos líneas recombinantes, la 8 y la 10, las cuales mostraron un fenotipo similar en la musculatura somática embrionaria. La línea empleada para los experimentos mostrados en este trabajo fue el recombinante 10.

Generación del cromosoma 2 *vkg::GFP* , *perd*^{F1-3}

Al igual que *perd*, el gen *vkg* también se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 2 de *Drosophila*. La posición citogenética del locus de *vkg* es 25C (localización genética 15), por lo que la distancia con el locus de *perd* (ver arriba) es de 38,9 unidades, existiendo una frecuencia de recombinación entre ambos loci del 38,9 %. Esto implica una probabilidad de obtener un cromosoma de cada 5,14 con la recombinación deseada.

Para la obtención de cromosomas recombinantes con los alelos *vkg::GFP* y *perd*^{F1-3}, se empleó la misma estrategia desarrollada para generar el cromosoma *lanB1*^{1P3} , *perd*^{F1-3} (ver arriba). En este caso, aunque la presencia del alelo *perd*^{F1-3} se determinó también mediante test de letalidad (ver arriba), la presencia del alelo *vkg::GFP* se llevó a cabo por la detección de señal verde fluorescente en el estadio larvario. De este modo, se generaron tres líneas recombinantes. La línea empleada para los experimentos mostrados en este trabajo fue el recombinante 9.

• Sistema UAS/GAL4/GAL80

La técnica UAS/GAL4 permite controlar a nivel temporal y espacial la expresión de secuencias génicas ectópicas en *Drosophila* (Brand and Perrimon, 1993). Este sistema, originario de levaduras, consta fundamentalmente de dos elementos: el factor de transcripción GAL4 y una secuencia UAS (del inglés “upstream activation sequence”) a la que GAL4 se une específicamente. La aplicación de este sistema consiste en combinar una línea transgénica donde la secuencia codificante de GAL4 es regulada por un promotor específico de un tipo celular o de tejido, junto a otra línea en la que una secuencia codificante de interés se sitúa corriente abajo de UAS (Fig. 40A). La actividad de la proteína GAL4 es dependiente de temperatura. Debido a las condiciones fisiológicas de *Drosophila*, la

MATERIAL Y MÉTODOS

temperatura empleada en los ensayos experimentales está comprendida entre los 18 °C y los 29 °C. Dentro de este rango, la actividad de GAL4 es mayor cuanto más alta sea la temperatura (Duffy, 2000). Además del control de la expresión de genes ectópicos que permite la elección de la temperatura y del promotor que regule GAL4, también se puede utilizar una tercera línea transgénica, que expresa de manera constitutiva un represor termosensible de GAL4, denominado GAL80ts. A 18 °C GAL80ts es activo, bloqueando la actividad de GAL4, mientras que a 29 °C GAL80ts es inactivo y GAL4 puede activar la transcripción de UAS (Pfeiffer et al., 2010) (Fig. 40B). El control de la expresión transitoria de las distintas líneas UAS empleadas en este trabajo, es detallado en cada caso (sección Resultados).

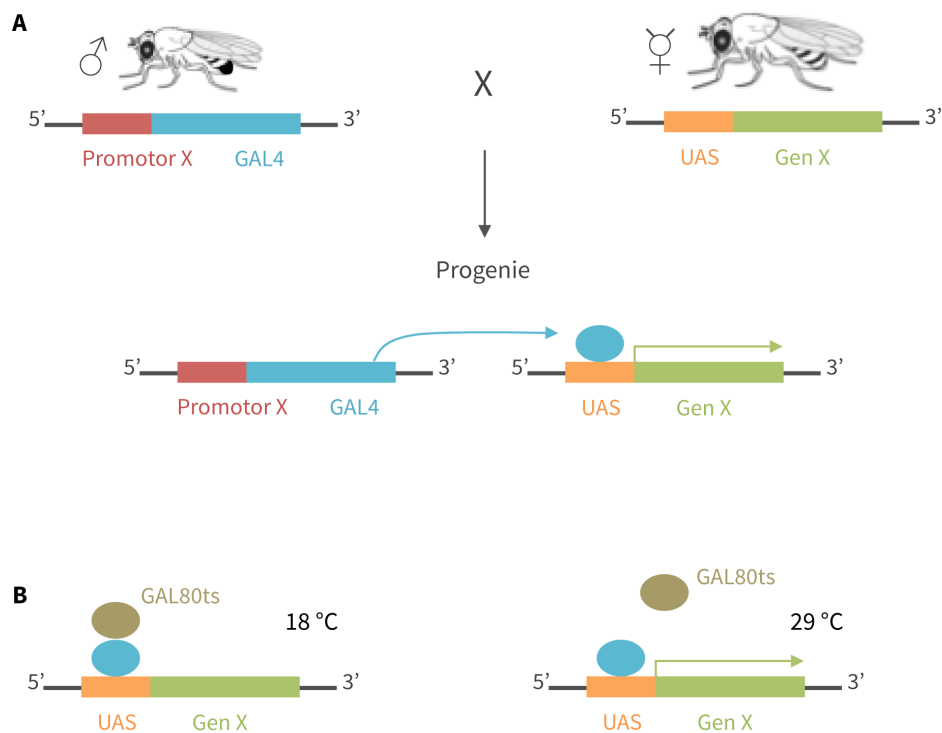


Figura 40

Sistema UAS/GAL4/GAL80. (A) Esquema de la aplicación del sistema UAS/GAL4, que permite la expresión de una secuencia génica de interés (gen X) mediante el control indirecto de un promotor específico (promotor X). El género representado para los organismos parentales es aleatorio. (B) La adición de una tercera construcción en el genoma del organismo produce la expresión basal de GAL80. A 18 °C GAL80ts actúa como represor de GAL4, bloqueando la expresión génica. A 29 °C GAL80ts es inactivo y GAL4 activa la transcripción de UAS.

Inmunohistoquímica

- **Tinción de embriones**

Para recoger los embriones, se colocaron machos y hembras adultos del genotipo de interés en cajas de puesta. Estas cajas incluyeron un recipiente perforado (para permitir la entrada de oxígeno) con una placa de manzana (ver receta al final del apartado) en la base. Transcurrido el tiempo para que los embriones depositados en las placas de manzana alcanzasen el estadio deseado (Weigmann et al., 2003), se procedió a su recolección. Para ello, se disolvió la placa de manzana con la ayuda de un pincel y la aplicación de agua destilada. A continuación, esta solución fue filtrada por un colador, donde quedaron retenidos los embriones. Mediante la aplicación de agua destilada, se limpiaron los embriones retenidos en el colador.

Para eliminar el corion (cáscara o capa que recubre el embrión), el colador con los embriones se incubó en lejía (Conejo) al 50 % durante 4 minutos. Pasado este tiempo, se neutralizó la lejía mediante la aplicación de tritón X-100 (Panreac) al 0,1 %, y finalmente se lavaron los embriones con agua destilada.

Tras retirar el exceso de agua de las paredes del colador, se procedió a recoger los embriones con la ayuda de un pincel. Debido a la ausencia de corion, los embriones se depositaron rápidamente en la solución fijadora (ver receta al final del apartado), antes de que pudieran secarse. Los embriones se incubaron en esta solución durante 15 minutos a 125 rpm a temperatura ambiente. Como resultado, se obtuvieron dos fases diferenciables (arriba el heptano y abajo el formaldehído) y los embriones fijados en la interfase. En primer lugar, se retiró toda la fase inferior (formaldehído), y luego se añadieron 3 mL de metanol (Panreac). Tras mezclar vigorosamente durante 1 minuto, se volvieron a observar dos fases (heptano en la superior y metanol en la inferior). Sin embargo, ahora los embriones quedaron en el fondo del tubo, como resultado de la perforación de su membrana vitelina por el metanol. La membrana vitelina, que recubre el embrión, debe ser perforada de este modo para permitir el posterior acceso de los anticuerpos en el proceso de

MATERIAL Y MÉTODOS

inmunohistoquímica. A continuación, los embriones se pasaron a un tubo eppendorf, y tras realizar 4-5 lavados con metanol para eliminar los restos de membrana vitelina, se almacenaron en metanol a -20 °C hasta su uso.

Los embriones fijados y almacenados en metanol (ver apartado anterior) se hidrataron en tampón fosfato (PBS, del inglés “phosphate buffered saline”) con Tween 20 al 0,2 % (PBS-Tween; ver receta al final del apartado). Para ello, en primer lugar se retiró el metanol y se añadió 1 mL de PBS-Tween/metanol (50 %/50 %). En esta solución se incubaron durante 5 minutos con agitación. A continuación, se realizaron 4 lavados de 10-15 minutos con PBS-Tween en agitación.

Los embriones ya hidratados, se incubaron o/n a 4 °C con los anticuerpos primarios (disueltos en PBS-Tween a la concentración requerida en cada caso). Luego, se retiró toda la solución, y se realizaron 4 lavados de 10-15 minutos con PBS-Tween en agitación.

Posteriormente, se retiró todo el PBS-Tween y se añadieron los anticuerpos secundarios (disueltos en PBS-Tween a la concentración requerida en cada caso), dejándose incubar durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Esta incubación se protegió de la luz a fin de preservar la fluorescencia de los fluoróforos presentes en los anticuerpos secundarios. Luego, se retiró toda la solución, y se realizaron 4 lavados de 10-15 minutos con PBS-Tween en agitación.

Finalmente, se realizó el montaje de los embriones para su observación en el microscopio. Para ello, se retiró todo el PBS-Tween posible y se añadió medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories). Tras dejar durante unos 10 minutos que los embriones absorbieran el medio, se añadieron a un portaobjetos con la ayuda de una pipeta P1000 con la punta cortada. En este portaobjetos se colocaron en ambos extremos dos o tres capas de papel celo con el objetivo de soportar el peso de cubreobjetos con el que finalmente se montó la muestra.

Recetas

Placas de manzana (1 L):

1. Mezclar 15 g de Glucosa (Sigma), 25 g de agar (Sigma) y 750 mL de agua destilada.
2. Disolver la mezcla en el microondas y añadir 250 mL de zumo de manzana.
3. Cuando la temperatura descienda a 65 °C añadir 5 mL de penicilina-estreptomicina.

Penicilina-Estreptomicina (100mL):

Penicilina G (Life Technologies)	0,6 g
Estreptomicina (Life Technologies)	1 g
NaCl (Sigma)	0,9 g
Agua destilada	hasta completar 100 mL

4. Añadir 5 mL de Nipagín (sigma) 10% en etanol.
5. Plaquear, y una vez solidificada la mezcla, almacenar a 4 °C hasta su uso.

Solución fijadora para embriones (6 mL):

Agua destilada	1995 µL
PEM 5x (PIPES (Sigma) 0,5 M, pH 6.9; MgSO ₄ (Sigma) 10 mM; EGTA (Sigma) 5 mM, pH 8)	600 µL
Formaldehído 37 % (AppliChem)	405 µL
Heptano (Panreac)	3 mL
Preparar toda la solución exceptuando el Heptano. Justo antes de usar, añadirlo y mezclar la solución.	

PBS-Tween (500 mL):

PBS (Gibco) 10x (10 tabletas en 500 mL de agua destilada)	50 mL
Tween 20 (Sigma)	1 mL (0,2 %)
Agua destilada	449 mL

• Tinción de pupa/adulto

En el caso de la pupa/adulto hubo que realizar un proceso de disección previo a la fijación. En primer lugar se colocó una cinta adhesiva de doble cara en un portaobjetos, sobre la cual se colocó la muestra fin de inmovilizarla y facilitar su disección. Previamente, en el caso de organismos adultos, se seccionaron las patas y las alas para impedir que el animal escapara una vez colocado en la cinta adhesiva. Para ello se durmió a los animales con CO₂. Por otra parte, las muestras del estadio pupal (Bainbridge and Bownes, 1981)

MATERIAL Y MÉTODOS

deseado se recolectaron con la ayuda de un pincel humedecido en PBS. Tanto los organismos de estadio pupal como los de estadio adulto se colocaron en la cinta adhesiva con una orientación específica dependiendo del corte a realizar. Para obtener la región dorsal del abdomen (corte frontal), la muestra se colocó con uno de los laterales pegado a la cinta adhesiva, mientras que para diseccionar el tórax (corte transversal o sagital), los animales se colocaron con la parte ventral pegada a la cinta adhesiva.

Tras el corte del animal, se colocó la mitad deseada en PBS a 4 °C para evitar la degradación de los tejidos. En el caso de la región torácica las muestras se fijaron a continuación. No obstante, en el caso del abdomen hubo que retirar previamente los tejidos no deseados. Para ello, se empleó una pipeta P200 y unas pinzas, lo que permitió el lavado del interior del abdomen de células de la grasa y otros tejidos, y la retirada de tráqueas o restos de intestino. Tanto la eliminación de estos tejidos, como de la partes laterales del abdomen que quedaron dependiendo de la altura del corte realizado, resultaron esenciales para que la musculatura fuera accesible para su posterior visualización. Debido a la fragilidad de la epidermis, no fue posible diseccionar regiones abdominales de estadio pupal inferior a las ≈50h APF.

A continuación se procedió a fijar las muestras. Para ello, se colocaron en una placa multipocillo y se incubaron en solución fijadora (ver receta al final del apartado) durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. En el caso de los abdómenes, antes de añadir la solución fijadora se colocaron las muestras en el pocillo totalmente estiradas, evitando que se quedasen fijadas de manera plegada y por tanto inaccesibles para su visualización. Una vez finalizado el periodo de fijación, se lavaron las muestras mediante el empleo de PBS-Tritón X-100 0,3 % (PBS-Tritón; ver receta al final del apartado). Se realizaron 3 lavados de 10-15 minutos con PBS-Tritón en agitación.

Las muestras fijadas se incubaron o/n a 4 °C con los anticuerpos primarios (disueltos en PBS-Tritón a la concentración requerida en cada caso). Luego, se retiró toda la solución, y se realizaron 3 lavados de 10-15 minutos con PBS-Tritón en agitación.

Posteriormente, se retiró todo el PBS-Tritón y se añadieron los anticuerpos secundarios (disueltos en PBS-Tritón a la concentración requerida en cada caso), dejándose incubar durante 2 h a temperatura ambiente en agitación. Esta incubación se protegió de la luz a fin de preservar la fluorescencia de los fluoróforos presentes en los anticuerpos secundarios. Luego, se retiró toda la solución, y se realizaron 3 lavados de 10-15 minutos con PBS-Tritón en agitación.

Finalmente, se realizó el montaje de las muestras para su observación en el microscopio. Para ello, las muestras se recolectaron con unas pinzas y se colocaron en un portaobjetos con medio de montaje Vectashield. Las muestras se colocaron de modo que la región donde se hizo el corte quedara orientada hacia arriba. Finalmente se colocó un cubreobjetos y se sellaron los bordes con laca de uñas para evitar la desecación de la muestra.

Para los ensayos donde se indujo el estado de relajación de las fibras musculares, todo el proceso se realizó del modo descrito anteriormente pero con las siguientes diferencias: las muestras se diseccionaron en solución de relajación (Burkart et al., 2007; Weitkunat and Schnorrer, 2014) en lugar de en PBS. La fijación se realizó en solución de relajación con paraformaldehído al 4 %.

Recetas

Solución fijadora (60 mL):

1. Añadir 2,4 g de paraformaldehído (Sigma) (concentración final=4 %) y 40 mL de agua destilada.
2. Añadir NaOH 5M (Sigma) hasta disolver el paraformaldehído.
3. Añadir 6 mL de PBS 10X y ajustar pH 6,5-7.
4. Añadir 600 µL de tween 20 al 10 %.
5. Completar volumen de la mezcla hasta 60 mL con agua destilada.
6. Almacenar en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

PBS-Tritón (500 mL):

PBS (Gibco) 10x (10 tabletas en 500 mL de agua destilada)	50 mL
Tritón X-100 (Panreac)	1,5 mL (0,3 %)
Agua destilada	449 mL

Solución de relajación:

<i>PBS (Gibco) 10x (10 tabletas en 500 mL de agua destilada)</i>	20 mM
<i>MgCl₂ (Sigma)</i>	5 mM
<i>EGTA (Sigma)</i>	5 mM
<i>DTT (Sigma)</i>	5 mM
<i>ATP (Sigma)</i>	5 mM
<i>Tritón X-100 (Panreac)</i>	0,3 %

• Anticuerpos y microscopía

Anticuerpos 1 ^{os}	Concentración	Procedencia
Conejo anti-Zormin	1:200	Dr. B. Bullard (Bullard et al., 2005)
Conejo anti-GFP	1:400	Life Technologies
Rata anti-RFP	1:200	Chromotek
Rata anti-HA	1:400	Roche
Conejo anti-HA	1:1000	Abcam
Ratón anti-integrina β PS	1:100	Hybridoma Bank
Rata anti-MHC	1:400	Babraham Bioscience Technologies
Rata anti-Tropomiosina	1:400	Babraham Bioscience Technologies
Conejo anti-LanB1	1:1000	Hybridoma Bank
Conejo anti-Perlecan	1:600	Dr. A. González Reyes (sin publicar)
Ratón anti- β Gal	1:10000	Promega
Cobaya anti-Perd	1:1000	Dra. B. Estrada (sin publicar)
Conejo anti- β Gal	1:5000	Cappel Antibodies
Conejo anti-GFP	1:10000 en embrión 1:500 en adulto	Life Technologies
Pollo anti-GFP	1:500	Abcam

Anticuerpos 2 ^{os} (fluoróforo conjugado)	Concentración	Procedencia
Cabra anti-IgG de conejo (Alexa 488)	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de rata (Cy3)	1:200	Jackson

Cabra anti-IgG de rata (Cy5)	1:200	Jackson
Cabra anti-IgG de cobaya (555)	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de ratón (488)	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de conejo (Cy5)	1:200	Jackson
Cabra anti-IgG de rata (Texas Red)	1:200	Life Technologies
Cabra anti-IgG de pollo (488)	1:200	Life Technologies

Anticuerpos 1^{os} conjugados y otros marcadores:

Las tinciones realizadas para visualizar la actina se realizaron con los anticuerpos conjugados Rodamina-Faloidina (Biotium) y Alexa 488–Faloidina (Life Technologies). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente con dichos anticuerpos a una concentración 1:1000 durante 30 minutos con agitación. Para marcar los nervios, las muestras se incubaron con el anticuerpo cabra anti-HRP (Cy3) (Jackson) a una concentración 1:100 durante 2 horas con agitación. En caso de combinarse con anticuerpos secundarios, la incubación de los anticuerpos conjugados se realizó después de los lavados de los anticuerpos secundarios. Para el marcaje de los núcleos se empleó el colorante TO-PRO 3 (Molecular Probes, Life Technologies), que se une al ADN. Las muestras se incubaron con TO-PRO 3 1:1000 durante 10 minutos y fueron posteriormente lavadas como último paso antes de su montaje.

Microscopía:

Todas las imágenes confocales se obtuvieron en un microscopio Leica SP2-AOBS, empleándose los objetivos 10x, 20x y 40x. Las imágenes adquiridas se procesaron y analizaron con el software ImageJ (NIH, Bethesda) y Adobe Photoshop.

Ensayo de capacidad de escalada

Para estimar el estado de la función muscular, se realizó un test de la capacidad de escalada. Desde su planteamiento original (Benzer, 1973), este test ha sido ampliamente

utilizado en *Drosophila* para estimar la capacidad locomotora del animal en diferentes condiciones genéticas y/o ambientales (Demontis and Perrimon, 2010; Perkins et al., 2010; Ueyama et al., 2010). Para el ensayo realizado en esta tesis, se seleccionaron los siguientes animales. Individuos macho de las líneas *UAS-perd ARNi 106680 / (CyO)*, *UAS-perd ARNi JF01159* y *UAS-mys ARNi* se cruzaron con hembras vírgenes *Gal80 ; Mef2-GAL4* a 18 ° C. A las 0-24h después de la eclosión pupal de la progenie de dichos cruces, se seleccionaron los individuos macho y se incubaron a 29 ° C. Estos machos se sometieron al test de escalada ese mismo día (día 0) y los sucesivos días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20. En el caso de la línea *UAS-perd ARNi 106680 / (CyO)* que no era homocigótica, parte de la progenie llevaba el cromosoma del ARNi y la otra parte el cromosoma balanceador. Aquellas moscas que portaban el balanceador se emplearon como línea control del ensayo.

El test de capacidad de escalada se realizó del siguiente modo: Grupos de 4-7 individuos del mismo genotipo y edad se colocaron en un tubo de cultivo de *Drosophila* estándar vacío. Mediante un golpe de la base del tubo con la superficie de apoyo, todos los animales cayeron al fondo del tubo. En ese momento se inició el cronómetro, y pasados 10 segundos se cuantificó el número de moscas que habían alcanzado la altura de 7,5 cm (marcada en el tubo) respecto al total de individuos encontrados en el tubo. Este procedimiento se repitió tres veces cada día de ensayo, dejando unos minutos de espaciamiento entre cada réplica. Solo se contabilizaron aquellas réplicas en las que los animales subieron por la pared del tubo escalando sin utilizar su capacidad de vuelo.

PCR cuantitativa (qPCR)

Los niveles relativos de expresión del ARNm de *perd* se determinaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Esta técnica permite estimar de manera relativa la cantidad de ADN en cada ciclo de una reacción de PCR mediante el empleo de fluoróforos asociados a los amplicones. Concretamente, en este trabajo se utilizó SYBR Green, que se intercala entre las bases del ADN de doble cadena, produciendo una fuerte señal fluorescente (VanGuilder et al., 2008).

Con el objetivo de analizar la reducción de los niveles de ARNm de *perd* que producían las líneas *ARNi 106680* y *JF01159*, se cruzaron machos de ambas líneas, así como de la cepa *yw* (línea control), con hembras vírgenes *mef2-GAL4* a 18 °C. Una vez que las progenies alcanzaron los primeros estadios larvarios (1-2) se aplicó una temperatura de 29 °C. A las 100h APF, entre 5 y 10 pupas de cada cruce se sometieron a tratamiento con el reactivo TRIzol (Invitrogen), aislándose su ARN. La pureza y concentración del ARN extraído se analizó con el espectrofotómetro Thermo Nanodrop ND 1000. Además, para analizar la integridad del ARN, las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (ver apartado recetas). Posteriormente, para eliminar la posible contaminación de restos de ADN, las muestras de ARN se trataron con RQ1 RNase-Free DNase (Promega). De cada muestra se procesaron 2 µg de ARN. Todas las muestras de ARN se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para poder llevar a cabo el proceso de retrotranscripción, hubo que realizar un paso de limpieza de las muestras obtenidas en el paso anterior. Para ello, se mezcló e incubó durante 3 minutos cada muestra con 100 µL de TRIzol y 20 µL de cloroformo (Sigma). Luego se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. A la fase acuosa obtenida, se le añadieron 50 µL de isopropanol (Sigma). Tras incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, y el pellet se lavó con 100 µL de etanol (Panreac) al 75 %. A continuación, se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4 °C. El pellet resultante, se aisló del sobrenadante y se resuspendió en 10 µL de agua destilada. La pureza y concentración de las muestras obtenidas se analizó con el espectrofotómetro Thermo Nanodrop ND 1000.

1 µg de cada muestra (ARN libre de ADN y limpiado con TRIzol/Cloroformo) se utilizó como molde para la generación de ADNc mediante el empleo de SuperScript III First Synthesis Supermix (Invitrogen). Los únicos oligonucleótidos empleados en esta reacción fueron los oligo(dT)₂₀, suministrados en el kit. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para verificar que las dos parejas de oligonucleótidos que se iban a emplear en la reacción de qPCR producían los amplicones deseados, se realizaron sendas reacciones de PCR (una para cada pareja). Para ello se utilizó la termocicladora MyCycler (Biorad). Las parejas de oligonucleótidos utilizadas y las condiciones de las reacciones de PCR son descritas a continuación:

Para detectar el ARNm de *perd*:

Perd (sentido): 5'-CCGCCAACAAATCCACTACT-3'

Perd (antisentido): 5'-ATCGAATTGGAAACGCTTGT-3'

Para detectar el ARNm de *RPL32* (gen control; ver abajo):

RPL32 (sentido): 5'-GCAAGCCCAAGGGTATCGA-3'

RPL32 (antidentido): 5'-CGATGTTGGGCATCAGATACTG-3'

GoTaq Flexi DNA pol (5U/ μ L) (Promega)	0,53 μ L
Green GoTaq Flexi (5x) (Promega)	14 μ L
MgCl ₂ (25mM) (Sigma)	4,2 μ L
dNTPmix (10mM cada uno) (Bioline)	1,4 μ L
Oligonucleótido sentido (10 μ M)	1,4 μ L
Oligonucleótidos antisentido (10 μ M)	1,4 μ L
ADNc muestra control (4,5 ng/ μ L)	1 μ L
Agua destilada	43,58 μ L

95° C 2 minutos

95° C 20 segundos

60° C 30 segundos

72° C 15 segundos

40x

Las muestras obtenidas fueron sometidas posteriormente a electroforesis en gel de agarosa (Sigma) 1,8 % en TBE (ver receta al final del apartado) 0,5X, y las bandas se visualizaron con bromuro de etidio. En ambas reacciones se observó una sola banda del tamaño esperado.

Para determinar la eficiencia de amplificación de cada pareja de oligonucleótidos, se realizaron distintas reacciones de qPCR empleando 1, 5, 10, 20 y 100 ng de molde (ADNc muestra control) de la reacción con cada una de las parejas de oligonucleótidos. Estas reacciones se realizaron empleando Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) y un termociclador Abi Prism 7000 (Applied Biosystems). Las rectas de amplificación obtenidas con cada pareja de oligonucleótidos, revelaron una eficiencia de amplificación similar (Livak and Schmittgen, 2001). Para todas las reacciones de qPCR llevadas a cabo en el presente estudio se empleó el programa detallado a continuación:

50° C 2 minutos	
95° C 10 minutos	
95° C 15 segundos	40x
60° C 1 minuto	
95° C 15 minutos	
60° C 20 segundos	Curva de disociación
95° C 15 segundos	

Para estimar las cantidades relativas de ARNm de *perd* en las diferentes muestras experimentales, se realizaron reacciones de qPCR empleando 10 ng del ANDc obtenido del paso de la retrotranscripción. De este modo, se realizó una reacción de qPCR para cada muestra biológica con cada uno de las parejas de oligonucleótidos. De cada una de estas reacciones se hicieron tres réplicas, de donde se obtuvo el valor C_T medio. El volumen de cada reacción fue de 20 μ L.

El valor C_T es inversamente proporcional a la cantidad de copias del amplicón detectado (VanGuilder et al., 2008). En base a los valores de C_T obtenidos, se determinaron los niveles de expresión relativa del ARNm de *perd*. Para ello se aplicó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001), que permitió normalizar los datos entre las distintas muestras en base a los C_T obtenidos para el amplicón de un gen control o normalizador (VanGuilder et al., 2008). Como gen normalizador se escogió *RPL32*, que codifica la proteína ribosomal L32, y que se ha utilizado previamente en este sistema con la misma finalidad (Johnson et al., 2013;

MATERIAL Y MÉTODOS

Marrone et al., 2011; Ueyama et al., 2010). Las curvas de disociación obtenidas confirmaron la presencia de un único tipo de amplicón para cada pareja de oligonucleótidos. Como controles, se llevó a cabo una reacción empleando agua destilada como molde, así como una reacción donde el molde fue ARN del paso previo a la retrotranscripción (control presencia de ADN genómico). En ambos casos no se obtuvo valor C_T .

Recetas

Electroforesis desnaturalizante:

Tampón de carga:

Formamida desionizada (Riedel-de Haën)	500 μ L
MOPS 10x (MOPS (Sigma) 0,2 M; NaCH ₃ COO (Sigma) 0,05 M; EDTA (Sigma) 0,01 M; pH 7)	100 μ L
Formaldehído 37% (AppliChem)	150 μ L
Bromuro de etidio (Sigma) 1 mg/mL	50 μ L
Se hacen alícuotas y se almacena a -20 °C hasta su uso.	

Gel:

MOPS (Sigma) 10x	3 mL
Agarosa (Sigma)	0,36 g (1,2 %)
Formaldehído 37 % (AppliChem)	1 mL
Agua destilada	26,1 mL

A cada 2 μ L de ARN se le añaden 8 μ L de tampón de carga. Tampón de electroforesis: MOPS 1x.

TBE 5x (500 mL):

Tris base (Sigma)	27 g
Ácido bórico (Sigma)	13,75 g
EDTA (Sigma) 0,5 M pH 8	10 mL
Agua destilada	hasta completar 500 mL

Análisis estadístico

A lo largo de este trabajo, se compararon estadísticamente las diferencias entre diferentes genotipos en algunas variables de interés. Para ello, se realizó el test de T de

Student. En aquellos casos en los que los valores de las variables no se ajustaron a una distribución paramétrica, se empleó el test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software R (<http://www.r-project.org/>). Los resultados de las cuantificaciones aparecen representados del siguiente modo: las barras representan la media, y las barras de error la desviación estándar.

Bibliografía

- Abmayr, S. M. and Pavlath, G. K.** (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **139**, 641–56.
- Anant, S., Roy, S. and VijayRaghavan, K.** (1998). Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in *Drosophila*. *Development* **125**, 1361–9.
- Ashley, J., Packard, M., Ataman, B. and Budnik, V.** (2005). Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J. Neurosci.* **25**, 5943–55.
- Ataman, B., Ashley, J., Gorczyca, D., Gorczyca, M., Mathew, D., Wichmann, C., Sigrist, S. J. and Budnik, V.** (2006). Nuclear trafficking of *Drosophila* Frizzled-2 during synapse development requires the PDZ protein dGRIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7841–6.
- Atreya, K. B. and Fernandes, J. J.** (2008). Founder cells regulate fiber number but not fiber formation during adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **321**, 123–40.
- Au, Y.** (2004). The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell. Mol. life Sci.* **61**, 3016–33.
- Baek, M. and Mann, R. S.** (2009). Lineage and birth date specify motor neuron targeting and dendritic architecture in adult *Drosophila*. *J. Neurosci.* **29**, 6904–16.
- Bainbridge, S. P. and Bownes, M.** (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **66**, 57–80.
- Baines, R. a, Uhler, J. P., Thompson, a, Sweeney, S. T. and Bate, M.** (2001). Altered electrical properties in *Drosophila* neurons developing without synaptic transmission. *J. Neurosci.* **21**, 1523–31.
- Barritt, D. S., Pearn, M. T., Zisch, A. H., Lee, S. S., Javier, R. T., Pasquale, E. B. and Stallcup, W. B.** (2000). The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2. *J. Cell. Biochem.* **79**, 213–24.
- Bate, M.** (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**, 791–804.
- Bate, M. and Arias, A. M.** (1993). *The Development of Drosophila Melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Bate, M., Rushton, E. and Currie, D. a** (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* **113**, 79–89.
- Baylies, M. K. and Bate, M.** (1996). twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* **272**, 1481–4.
- Baylies, M. K., Bate, M. and Ruiz-Gómez, M.** (1998). Myogenesis: A View from *Drosophila*. *Cell* **93**, 921–927.
- Beall, C. J., Sepanski, M. A. and Fyrberg, E. A.** (1989). Genetic dissection of *Drosophila* myofibril formation: effects of actin and myosin heavy chain null alleles. *Genes Dev.* **3**, 131–140.
- Benzer, S.** (1973). Genetic dissection of behavior. *Sci. Am.* **229**, 24–37.
- Beramendi, A. N. A., Peron, S., Casanova, G., Reggiani, C. and Cantera, R.** (2007). Neuromuscular Junction in Abdominal Muscles of *Drosophila melanogaster* During Adulthood and Aging. *J. Comp. Neurol.* **501**, 498–508.
- Berger, J. and Currie, P. D.** (2012). Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Dis. Model. Mech.* **5**, 726–32.
- Bier, E.** (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 9–23.
- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M. L., Mintz, A. and Delbono, O.** (2014). Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 245.
- Blaustein, M. P., Kao, J. P. and Matteson, D. R.** (2011). *Cellular physiology and neurophysiology*. 2nd Ed. Elsevier Mosby.
- Bloor, J. W. and Brown, N. H.** (1998). Genetic Analysis of the *Drosophila* alpha-PS2 Integrin Subunit Reveals Discrete Adhesive, Morphogenetic and Sarcomeric Functions. *Genetics* **148**, 1127–1142.
- Bloor, J. W. and Kiehart, D. P.** (2001). zipper Nonmuscle myosin-II functions downstream of PS2 integrin in *Drosophila* myogenesis and is necessary for myofibril formation. *Dev. Biol.* **239**, 215–28.

- Boateng, S. Y. and Goldspink, P. H.** (2008). Assembly and maintenance of the sarcomere night and day. *Cardiovasc. Res.* **77**, 667–75.
- Bökel, C. and Brown, N. H.** (2002). Integrins in Development : Moving on , Responding to , and Sticking to the Extracellular Matrix Integrins are cell surface receptors of the extracellular. *Dev. Cell* **3**, 311–321.
- Boncompagni, S., Kern, H., Rossini, K., Hofer, C., Mayr, W., Carraro, U. and Protasi, F.** (2007). Structural differentiation of skeletal muscle fibers in the absence of innervation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19339–44.
- Borchiellini, C., Coulon, J. and Le Parco, Y.** (1996). The function of type IV collagen during Drosophila muscle development. *Mech. Dev.* **58**, 179–91.
- Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M. and Nguyen, H. T.** (1995). Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* **9**, 730–41.
- Bozler, E.** (1954). Relaxation in extracted muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* **38**, 149–59.
- Brand, a H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–15.
- Broadie, K. S. and Bate, M.** (1991). The development of adult muscles in Drosophila: ablation of identified muscle precursor cells. *Development* **113**, 103–18.
- Broadie, K. and Bate, M.** (1993). Muscle development is independent of innervation during Drosophila embryogenesis. *Development* **119**, 533–43.
- Brown, N. H.** (2000). Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biol.* **19**, 191–201.
- Bryantsev, A. L., Baker, P. W., Lovato, T. L., Jaramillo, M. S. and Cripps, R. M.** (2012). Differential requirements for Myocyte Enhancer Factor-2 during adult myogenesis in Drosophila. *Dev. Biol.* **361**, 191–207.
- Bryson-Richardson, R. J. and Currie, P. D.** (2008). The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 632–46.

- Bullard, B., Burkart, C., Labeit, S. and Leonard, K.** (2005). The function of elastic proteins in the oscillatory contraction of insect flight muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**, 479–85.
- Bunch, T. A., Graner, M. W., Fessler, L. I., Fessler, J. H., Schneider, K. D., Kerschen, A., Choy, L. P., Burgess, B. W. and Brower, D. L.** (1998). The PS2 integrin ligand tiggren is required for proper muscle function in *Drosophila*. *Development* **125**, 1679–89.
- Burkart, C., Qiu, F., Brendel, S., Benes, V., Hååg, P., Labeit, S., Leonard, K. and Bullard, B.** (2007). Modular proteins from the *Drosophila* sallimus (sls) gene and their expression in muscles with different extensibility. *J. Mol. Biol.* **367**, 953–69.
- Burkin, D. J., Kim, J. E., Gu, M. and Kaufman, S. J.** (2000). Laminin and alpha7beta1 integrin regulate agrin-induced clustering of acetylcholine receptors. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 1), 2877–86.
- Burkin, D. J., Wallace, G. Q., Nicol, K. J., Kaufman, D. J. and Kaufman, S. J.** (2001). Enhanced Expression of the 7 1 Integrin Reduces Muscular Dystrophy and Restores Viability in Dystrophic Mice. *J. Cell Biol.* **152**, 1207–1218.
- Callahan, C. A., Bonkovsky, J. L., Scully, A. L. and Thomas, J. B.** (1996). *derailed* is required for muscle attachment site selection in *Drosophila*. *Development* **122**, 2761–7.
- Carmena, A., Bate, M. and Jimenez, F.** (1995). Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* **9**, 2373–2383.
- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F. and Chia, W.** (1998). *inscuteable* and *numb* mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev.* **12**, 304–315.
- Carmena, A., Buff, E., Halfon, M. S., Gisselbrecht, S., Jiménez, F., Baylies, M. K. and Michelson, A. M.** (2002). Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev. Biol.* **244**, 226–42.
- Carmignac, V. and Durbeej, M.** (2012). Cell-matrix interactions in muscle disease. *J. Pathol.* **226**, 200–18.

- Chan, W. P. and Dickinson, M. H.** (1996). In vivo length oscillations of indirect flight muscles in the fruit fly *Drosophila virilis*. *J. Exp. Biol.* **199**, 2767–74.
- Chanana, B., Graf, R., Koledachkina, T., Pflanz, R. and Vorbrüggen, G.** (2007). AlphaPS2 integrin-mediated muscle attachment in *Drosophila* requires the ECM protein Thrombospondin. *Mech. Dev.* **124**, 463–75.
- Chargé, S. B. P. and Rudnicki, M. a** (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209–38.
- Chatterjee, N., Stegmüller, J., Schätzle, P., Karram, K., Koroll, M., Werner, H. B., Nave, K.-A. and Trotter, J.** (2008). Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 8310–7.
- Ciglar, L. and Furlong, E. E. M.** (2009). Conservation and divergence in developmental networks: a view from *Drosophila* myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 754–60.
- Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C. and Gregorio, C. C.** (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 637–706.
- Collins, C. a and DiAntonio, A.** (2007). Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 35–42.
- Condon, K., Silberstein, L., Blau, H. M. and Thompson, W. J.** (1990). Differentiation of fiber types in aneural musculature of the prenatal rat hindlimb. *Dev. Biol.* **138**, 275–295.
- Couchman, J. R.** (2010). Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 89–114.
- Critchley, D. R. and Gingras, A. R.** (2008). Talin at a glance. *J. Cell Sci.* **121**, 1345–7.
- Currie, D. and Bate, M.** (1991). The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves. *Development* **113**, 91–102.
- Currie, D. a and Bate, M.** (1995). Innervation is essential for the development and differentiation of a sex-specific adult muscle in *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 2549–57.

- Daczewska, M., Picchio, L., Jagla, T., Figeac, N. and Jagla, K.** (2010). Muscle development and regeneration in normal and pathological conditions: learning from *Drosophila*. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 929–41.
- Dahmann, C.** (2008). Methods in Molecular Biology 420. In *Drosophila: Methods and Protocols* (ed. Dahmann, C.), p. 432. Humana Press.
- Danen, E. H. J. and Sonnenberg, A.** (2003). Integrins in regulation of tissue development and function. *J. Pathol.* **201**, 632–41.
- Davies, K. E. and Nowak, K. J.** (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 762–73.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B. G., Messina, G., Morosetti, R., et al.** (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 255–67.
- Demontis, F. and Perrimon, N.** (2010). FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell* **143**, 813–25.
- Demontis, F., Piccirillo, R., Goldberg, A. L. and Perrimon, N.** (2013a). Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Dis. Model. Mech.* **000**, 1–14.
- Demontis, F., Piccirillo, R., Goldberg, A. L. and Perrimon, N.** (2013b). The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan. *Aging Cell* **12**, 943–9.
- Dickinson, M. H.** (2005). The initiation and control of rapid flight maneuvers in fruit flies. *Integr. Comp. Biol.* **45**, 274–81.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151–6.
- Duffy, J. B.** (2000). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genes. (New York, N.Y.)* **34**, 1–15.
- Dutta, D. and VijayRaghavan, K.** (2006). Metamorphosis and the Formation of the Adult Musculature. In *Muscle Development in Drosophila*, pp. 125–142. Springer New York.

- Dutta, D., Anant, S., Ruiz-Gómez, M., Bate, M. and VijayRaghavan, K.** (2004). Founder myoblasts and fibre number during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development* **131**, 3761–72.
- Dutta, D., Shaw, S., Maqbool, T., Pandya, H. and Vijayraghavan, K.** (2005). *Drosophila* Heartless acts with Heartbroken/Dof in muscle founder differentiation. *PLoS Biol.* **3**, e337.
- Edgerton, V. R., Roy, R. R., Allen, D. L. and Monti, R. J.** (2002). Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **81**, S127–47.
- Eisenmann, K. M., McCarthy, J. B., Simpson, M. A., Keely, P. J., Guan, J. L., Tachibana, K., Lim, L., Manser, E., Furcht, L. T. and Iida, J.** (1999). Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas. *Nat. Cell Biol.* **1**, 507–13.
- Ervasti, J. M.** (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J. Biol. Chem.* **278**, 13591–4.
- Estrada, B., Choe, S. E., Gisselbrecht, S. S., Michaud, S., Raj, L., Busser, B. W., Halfon, M. S., Church, G. M. and Michelson, A. M.** (2006). An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes. *PLoS Genet.* **2**, e16.
- Estrada, B., Gisselbrecht, S. S. and Michelson, A. M.** (2007). The transmembrane protein Perdido interacts with Grip and integrins to mediate myotube projection and attachment in the *Drosophila* embryo. *Development* **134**, 4469–78.
- Fernandes, J. and Keshishian, H.** (1998). Nerve-muscle interactions during flight muscle development in *Drosophila*. *Development* **125**, 1769–1779.
- Fernandes, J., Bate, M. and Vijayraghavan, K.** (1991). Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* **113**, 67–77.
- Fujita, H., Nedachi, T. and Kanzaki, M.** (2007). Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. *Exp. Cell Res.* **313**, 1853–1865.
- Fukushi, J., Makgiansar, I. T. and Stallcup, W. B.** (2004). NG2 Proteoglycan Promotes Endothelial Cell Motility and Angiogenesis via Engagement of Galectin-3 and alpha3beta1 Integrin. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3580–3590.

- Goretzki, L., Burg, M. A., Grako, K. A. and Stallcup, W. B.** (1999). High-affinity binding of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-AA to the core protein of the NG2 proteoglycan. *J. Biol. Chem.* **274**, 16831–7.
- Goretzki, L., Lombardo, C. R. and Stallcup, W. B.** (2000). Binding of the NG2 proteoglycan to kringle domains modulates the functional properties of angiostatin and plasmin(ogen). *J. Biol. Chem.* **275**, 28625–33.
- Gotwals, P. J., Fessler, L. I., Wehrli, M. and Hynes, R. O.** (1994). Drosophila PS1 integrin is a laminin receptor and differs in ligand specificity from PS2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 11447–11451.
- Grosshans, J., Wenzl, C., Herz, H.-M., Bartoszewski, S., Schnorrer, F., Vogt, N., Schwarz, H. and Müller, H.-A.** (2005). RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during Drosophila cellularisation. *Development* **132**, 1009–20.
- Guerin, C. M. and Kramer, S. G.** (2009). Cytoskeletal remodeling during myotube assembly and guidance: coordinating the actin and microtubule networks. *Commun. Integr. Biol.* **2**, 452–7.
- Gullberg, D., Velling, T., Lohikangas, L. and Tiger, C. F.** (1998). Integrins during muscle development and in muscular dystrophies. *Front. Biosci.* **3**, D1039–50.
- Harris, A. J.** (1981). Embryonic growth and innervation of rat skeletal muscles. I. Neural regulation of muscle fibre numbers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **293**, 257–77.
- Hartenstein, V.** (1993). *Atlas of Drosophila development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harvey, P. A. and Leinwand, L. A.** (2011). The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J. Cell Biol.* **194**, 355–65.
- Hawke, T. J. and Garry, D. J.** (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* **91**, 534–51.
- Higashi, K., Higuchi, I., Niiyama, T., Uchida, Y., Shiraishi, T., Hashiguchi, A., Saito, A., Horikiri, T., Suehara, M., Arimura, K., et al.** (2006). Abnormal expression of proteoglycans in Ullrich’s disease with collagen VI deficiency. *Muscle Nerve* **33**, 120–6.

- Hodges, B. L., Hayashi, Y. K., Nonaka, I., Wang, W., Arahata, K. and Kaufman, S. J.** (1997). Altered expression of the $\alpha 7 \beta 1$ integrin in human and murine muscular dystrophies. *J. Cell Sci.* **110** (Pt 2, 2873–81.
- Hoh, J.** (1991). Myogenic Regulation of Mammalian Skeletal Muscle Fibres. *News Physiol Sci* **6**, 1–6.
- Holtzer, H., Hijikata, T., Lin, Z. X., Zhang, Z. Q., Holtzer, S., Protasi, F., Franzini-Armstrong, C. and Sweeney, H. L.** (1997). Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. *Cell Struct. Funct.* **22**, 83–93.
- Hoshijima, M., Sah, V. P., Wang, Y., Chien, K. R. and Brown, J. H.** (1998). The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 7725–30.
- Hresko, M. C., Williams, B. D. and Waterston, R. H.** (1994). Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **124**, 491–506.
- Huang, C. -c.** (2003). Laminin subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* **130**, 3343–3358.
- Iida, J., Skubitz, A. P., Furcht, L. T., Wayner, E. A. and McCarthy, J. B.** (1992). Coordinate role for cell surface chondroitin sulfate proteoglycan and $\alpha 4 \beta 1$ integrin in mediating melanoma cell adhesion to fibronectin. *J. Cell Biol.* **118**, 431–44.
- Iida, J., Meijne, A. M. L., Spiro, R. C., Roos, E., Furcht, L. T. and McCarthy, J. B.** (1995). Spreading and Focal Contact Formation of Human Melanoma Cells in Response to the Stimulation of Both Melanoma-associated Proteoglycan (NG2) and $\alpha 4 \beta 1$ Integrin. *Cancer Res.* **55**, 2177–2185.
- Iida, J., Pei, D., Kang, T., Simpson, M. A., Herlyn, M., Furcht, L. T. and McCarthy, J. B.** (2001). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *J. Biol. Chem.* **276**, 18786–94.

- Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 2700–4.
- Jang, Y.-N. and Baik, E. J.** (2013). JAK-STAT pathway and myogenic differentiation. *JAK-STAT* **2**, e23282.
- Jeleń, F., Oleksy, A., Smietana, K. and Otlewski, J.** (2003). PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta Biochim. Pol.* **50**, 985–1017.
- Johnson, A. N., Mokalled, M. H., Valera, J. M., Poss, K. D. and Olson, E. N.** (2013). Post-transcriptional regulation of myotube elongation and myogenesis by Hoi Polloi. *Development* **140**, 3645–56.
- Kanagawa, M. and Toda, T.** (2006). The genetic and molecular basis of muscular dystrophy: roles of cell-matrix linkage in the pathogenesis. *J. Hum. Genet.* **51**, 915–26.
- Karram, K., Chatterjee, N. and Trotter, J.** (2005). NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction. *J. Anat.* **207**, 735–44.
- Kramer, S. G., Kidd, T., Simpson, J. H. and Goodman, C. S.** (2001). Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science* **292**, 737–40.
- Krzemien, J., Fabre, C. C. G., Casal, J. and Lawrence, P. a.** (2011). The muscle pattern of the *Drosophila* abdomen depends on a subdivision of the anterior compartment of each segment. *Development* **139**, 75–83.
- Kummer, T. T., Misgeld, T. and Sanes, J. R.** (2006). Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 74–82.
- Labeau-Dimenna, E. M., Clark, K. a, Bauman, K. D., Parker, D. S., Cripps, R. M. and Geisbrecht, E. R.** (2012). Thin, a Trim32 ortholog, is essential for myofibril stability and is required for the integrity of the costamere in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17983–8.

- Lahaye, L. L., Wouda, R. R., de Jong, A. W. M., Fradkin, L. G. and Noordermeer, J. N.** (2012). WNT5 interacts with the Ryk receptors doughnut and derailed to mediate muscle attachment site selection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **7**, e32297.
- Laing, N. G., Davis, M. R., Bayley, K., Fletcher, S. and Wilton, S. D.** (2011). Molecular diagnosis of duchenne muscular dystrophy: past, present and future in relation to implementing therapies. *Clin. Biochem. Rev.* **32**, 129–34.
- Lee, H.-J. and Zheng, J. J.** (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun. Signal.* **8**, 8.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402–8.
- Lu, M. H., DiLullo, C., Schultheiss, T., Holtzer, S., Murray, J. M., Choi, J., Fischman, D. A. and Holtzer, H.** (1992). The vinculin/sarcomeric-alpha-actinin/alpha-actin nexus in cultured cardiac myocytes. *J. Cell Biol.* **117**, 1007–22.
- Mahr, A. and Aberle, H.** (2006). The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. *Gene Expr. Patterns* **6**, 299–309.
- Majumdar, M., Vuori, K. and Stallcup, W. B.** (2003). Engagement of the NG2 proteoglycan triggers cell spreading via rac and p130cas. *Cell. Signal.* **15**, 79–84.
- Makagiansar, I. T., Williams, S., Mustelin, T. and Stallcup, W. B.** (2007). Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKCalpha helps balance cell proliferation and migration. *J. Cell Biol.* **178**, 155–65.
- Maqbool, T. and Jagla, K.** (2007). Genetic control of muscle development: learning from *Drosophila*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **28**, 397–407.
- Marrone, A. K., Kucherenko, M. M., Wiek, R., Göpfert, M. C. and Shcherbata, H. R.** (2011). Hyperthermic seizures and aberrant cellular homeostasis in *Drosophila* dystrophic muscles. *Sci. Rep.* **1**, 47.
- Martin, P. T., Kaufman, S. J., Kramer, R. H. and Sanes, J. R.** (1996). Synaptic integrins in developing, adult, and mutant muscle: selective association of alpha1, alpha7A, and alpha7B integrins with the neuromuscular junction. *Dev. Biol.* **174**, 125–39.

- Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M. and Ringuette, M.** (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV- dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* **121**, 1671–1680.
- Mayer, U., Saher, G., Fässler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Pöschl, E. and von der Mark, K.** (1997). Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **17**, 318–23.
- Miller, A.** (1950). The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*. *Biol. Dros.* 420–534.
- Miller, D. L., Ballard, S. L. and Ganetzky, B.** (2012). Analysis of synaptic growth and function in *Drosophila* with an extended larval stage. *J. Neurosci.* **32**, 13776–86.
- Ninov, N., Chiarelli, D. A. and Martín-Blanco, E.** (2007). Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **134**, 367–79.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R. and Zhu, X.** (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 9–22.
- Nyland, L. R. and Maughan, D. W.** (2000). Morphology and transverse stiffness of *Drosophila* myofibrils measured by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **78**, 1490–7.
- Padash Barmchi, M., Rogers, S. and Häcker, U.** (2005). DRhoGEF2 regulates actin organization and contractility in the *Drosophila* blastoderm embryo. *J. Cell Biol.* **168**, 575–85.
- Perkins, A. D. and Tanentzapf, G.** (2014). An ongoing role for structural sarcomeric components in maintaining *Drosophila melanogaster* muscle function and structure. *PLoS One* **9**, e99362.
- Perkins, A. D., Ellis, S. J., Asghari, P., Shamsian, A., Moore, E. D. W. and Tanentzapf, G.** (2010). Integrin-mediated adhesion maintains sarcomeric integrity. *Dev. Biol.* **338**, 15–27.
- Perry, R. L. and Rudnick, M. A.** (2000). Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front. Biosci.* **5**, D750–67.

- Peter, A. K., Cheng, H., Ross, R. S., Knowlton, K. U. and Chen, J.** (2011). The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog. Pediatr. Cardiol.* **31**, 83–88.
- Petrini, S., Tessa, A., Carrozzo, R., Verardo, M., Pierini, R., Rizza, T. and Bertini, E.** (2003). Human melanoma/NG2 chondroitin sulfate proteoglycan is expressed in the sarcolemma of postnatal human skeletal myofibers. *Mol. Cell. Neurosci.* **23**, 219–231.
- Petrini, S., Tessa, A., Stallcup, W. B., Sabatelli, P., Pescatori, M., Giusti, B., Carrozzo, R., Verardo, M., Bergamin, N., Columbaro, M., et al.** (2005). Altered expression of the MCSP/NG2 chondroitin sulfate proteoglycan in collagen VI deficiency. *Mol. Cell. Neurosci.* **30**, 408–17.
- Pfeiffer, B. D., Ngo, T.-T. B., Hibbard, K. L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J. W. and Rubin, G. M.** (2010). Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics* **186**, 735–55.
- Piccirillo, R., Demontis, F., Perrimon, N. and Goldberg, A. L.** (2014). Mechanisms of muscle growth and atrophy in mammals and *Drosophila*. *Dev. Dyn.* **243**, 201–15.
- Quach, N. L. and Rando, T. a** (2006). Focal adhesion kinase is essential for costamero genesis in cultured skeletal muscle cells. *Dev. Biol.* **293**, 38–52.
- Raeker, M. Ö., Shavit, J. A., Dowling, J. J., Michele, D. E. and Russell, M. W.** (2014). Membrane-myofibril cross-talk in myofibrillogenesis and in muscular dystrophy pathogenesis: lessons from the zebrafish. *Front. Physiol.* **5**, 14.
- Rahimov, F. and Kunkel, L. M.** (2013). The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **201**, 499–510.
- Ranganathan, R. and Ross, E. M.** (1997). PDZ domain proteins: Scaffolds for signaling complexes. *Curr. Biol.* **7**, R770–R773.
- Ranganayakulu, G., Schulz, R. A. and Olson, E. N.** (1996). Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **176**, 143–8.
- Reedy, M. C. and Beall, C.** (1993a). Ultrastructure of developing flight muscle in *Drosophila*. I. Assembly of myofibrils. *Dev. Biol.* **160**, 443–65.

- Reedy, M. C. and Beall, C.** (1993b). Ultrastructure of developing flight muscle in *Drosophila*. II. Formation of the myotendon junction. *Dev. Biol.* **160**, 466–79.
- Rhee, D., Sanger, J. M. and Sanger, J. W.** (1994). The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* **28**, 1–24.
- Ribeiro, I., Yuan, L., Tanentzapf, G., Dowling, J. J. and Kiger, A.** (2011). Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance. *PLoS Genet.* **7**, e1001295.
- Ritzenthaler, S., Suzuki, E. and Chiba, A.** (2000). Postsynaptic filopodia in muscle cells interact with innervating motoneuron axons. *Nat. Neurosci.* **3**, 1012–7.
- Roote, J. and Prokop, A.** (2013). How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. *G3 (Bethesda)*. **3**, 353–8.
- Roy, S. and VijayRaghavan, K.** (1997). Homeotic genes and the regulation of myoblast migration, fusion, and fibre-specific gene expression during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development* **124**, 3333–41.
- Roy, S. and VijayRaghavan, K.** (1998). Patterning Muscles Using Organizers: Larval Muscle Templates and Adult Myoblasts Actively Interact to Pattern the Dorsal Longitudinal Flight Muscles of *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **141**, 1135–1145.
- Rui, Y., Bai, J. and Perrimon, N.** (2010). Sarcomere formation occurs by the assembly of multiple latent protein complexes. *PLoS Genet.* **6**, e1001208.
- Ruiz-Gómez, M. and Bate, M.** (1997). Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development* **124**, 4857–4866.
- Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M. V and Bate, M.** (2000). *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* **102**, 189–98.
- Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S. M., Michelson, a M. and Bate, M.** (1995). Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* **121**, 1979–88.
- Sakata, H., Sakabe, M., Matsui, H., Kawada, N., Nakatani, K., Ikeda, K., Yamagishi, T. and Nakajima, Y.** (2007). Rho kinase inhibitor Y27632 affects initial heart myofibrillogenesis in cultured chick blastoderm. *Dev. Dyn.* **236**, 461–72.

- Sanes, J. R.** (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **278**, 12601–4.
- Sanes, J. R. and Lichtman, J. W.** (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 791–805.
- Sanger, J. W., Kang, S., Siebrands, C. C., Freeman, N., Du, A., Wang, J., Stout, A. L. and Sanger, J. M.** (2005). How to build a myofibril. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**, 343–54.
- Sanger, J. W., Wang, J., Holloway, B., Du, A. and Sanger, J. M.** (2009). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in zebrafish. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 556–66.
- Schejter, E. D. and Baylies, M. K.** (2010). Born to run: creating the muscle fiber. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 566–74.
- Schnorrer, F. and Dickson, B. J.** (2004). Muscle building; mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev. Cell* **7**, 9–20.
- Schnorrer, F., Kalchauer, I. and Dickson, B. J.** (2007). The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in *Drosophila*. *Dev. Cell* **12**, 751–66.
- Schnorrer, F., Schönbauer, C., Langer, C. C. H., Dietzl, G., Novatchkova, M., Schernhuber, K., Fellner, M., Azaryan, A., Radolf, M., Stark, A., et al.** (2010). Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in *Drosophila*. *Nature* **464**, 287–91.
- Schönbauer, C., Distler, J., Jährling, N., Radolf, M., Dodt, H.-U., Frasch, M. and Schnorrer, F.** (2011). Spalt mediates an evolutionarily conserved switch to fibrillar muscle fate in insects. *Nature* **479**, 406–409.
- Schultheiss, T., Lin, Z. X., Lu, M. H., Murray, J., Fischman, D. A., Weber, K., Masaki, T., Imamura, M. and Holtzer, H.** (1990). Differential distribution of subsets of myofibrillar proteins in cardiac nonstriated and striated myofibrils. *J. Cell Biol.* **110**, 1159–72.
- Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O. M., Ruegg, U. T., Schittny, J. and Müller, U.** (2003). Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* **4**, 673–85.
- Schweitzer, R., Zelzer, E. and Volk, T.** (2010). Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development* **137**, 3347–3347.

- Simões, S., Denholm, B., Azevedo, D., Sotillos, S., Martin, P., Skaer, H., Hombría, J. C.-G. and Jacinto, A.** (2006). Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis. *Development* **133**, 4257–67.
- Sohal, G. S. and Holt, R. K.** (1980). Role of innervation on the embryonic development of skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* **210**,.
- Soler, C., Han, J. and Taylor, M. V** (2012). The conserved transcription factor Mef2 has multiple roles in adult *Drosophila* musculature formation. *Development* **139**, 1270–5.
- Sparrow, J. C. and Schöck, F.** (2009). The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 293–8.
- Sparrow, J., Hughes, S. M. and Segalat, L.** (2008). Other model organisms for sarcomeric muscle diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **642**, 192–206.
- St Pierre, S. E., Ponting, L., Stefancsik, R. and McQuilton, P.** (2014). FlyBase 102--advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res.* **42**, D780–8.
- Stallcup, W. B.** (2002). The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J. Neurocytol.* **31**, 423–35.
- Stallcup, W. B. and Huang, F.-J.** (2008). A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh. Migr.* **2**, 192–201.
- Staub, E., Hinzmann, B. and Rosenthal, A.** (2002). A novel repeat in the melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan defines a new protein family. *FEBS Lett.* **527**, 114–8.
- Stegmüller, J., Werner, H., Nave, K.-A. and Trotter, J.** (2003). The proteoglycan NG2 is complexed with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ glutamate receptor interaction protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 3590–8.
- Steinmetz, P. R. H., Kraus, J. E. M., Larroux, C., Hammel, J. U., Amon-Hassenzahl, A., Houlston, E., Wörheide, G., Nickel, M., Degnan, B. M. and Technau, U.** (2012). Independent evolution of striated muscles in cnidarians and bilaterians. *Nature* **487**, 231–4.

- Subramanian, A., Wayburn, B., Bunch, T. and Volk, T.** (2007). Thrombospondin-mediated adhesion is essential for the formation of the myotendinous junction in *Drosophila*. *Development* **134**, 1269–78.
- Sudarsan, V., Anant, S., Guptan, P., VijayRaghavan, K. and Skaer, H.** (2001). Myoblast diversification and ectodermal signaling in *Drosophila*. *Dev. Cell* **1**, 829–39.
- Swan, L. E., Wichmann, C., Prange, U., Schmid, A., Schmidt, M., Schwarz, T., Ponimaskin, E., Madeo, F., Vorbrüggen, G. and Sigrist, S. J.** (2004). A glutamate receptor-interacting protein homolog organizes muscle guidance in *Drosophila*. *Genes Dev.* **18**, 223–37.
- Swan, L. E., Schmidt, M., Schwarz, T., Ponimaskin, E., Prange, U., Boeckers, T., Thomas, U. and Sigrist, S. J.** (2006). Complex interaction of *Drosophila* GRIP PDZ domains and Echinoid during muscle morphogenesis. *EMBO J.* **25**, 3640–51.
- Sweeney, S. T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H. and O’Kane, C. J.** (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* **14**, 341–51.
- Taylor, M. V** (2006). Comparison of Muscle Development in *Drosophila* and Vertebrates. In *Muscle development in Drosophila* (ed. Sink, H.), pp. 169–203. Springer.
- Thompson, L. V** (2002). Skeletal muscle adaptations with age, inactivity, and therapeutic exercise. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* **32**, 44–57.
- Thorsteinsdóttir, S., Deries, M., Cachaço, A. S. and Bajanca, F.** (2011). The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev. Biol.* **354**, 191–207.
- Tillet, E., Ruggiero, F., Nishiyama, A. and Stallcup, W. B.** (1997). The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 10769–76.
- Tillet, E., Gentil, B., Garrone, R. and Stallcup, W. B.** (2002). NG2 proteoglycan mediates beta1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *J. Cell. Biochem.* **86**, 726–36.
- Tixier, V., Bataillé, L. and Jagla, K.** (2010). Diversification of muscle types: recent insights from *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* **316**, 3019–27.

- Trotter, J., Karram, K. and Nishiyama, A.** (2010). NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res. Rev.* **63**, 72–82.
- Truman, W. Kimura, K.** (1990). Postmetamorphic Cell Death in the Nervous of *Drosophila melanogaster* and Muscular Systems. *J. Neurosci.* **10**, 403–411.
- Ueyama, M., Akimoto, Y., Ichimiya, T., Ueda, R., Kawakami, H., Aigaki, T. and Nishihara, S.** (2010). Increased apoptosis of myoblasts in *Drosophila* model for the Walker-Warburg syndrome. *PLoS One* **5**, e11557.
- Urbano, J. M., Torgler, C. N., Molnar, C., Tepass, U., López-Varea, A., Brown, N. H., de Celis, J. F. and Martín-Bermudo, M. D.** (2009). *Drosophila* laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis. *Development* **136**, 4165–76.
- Vachon, P. H., Xu, H., Liu, L., Loechel, F., Hayashi, Y., Arahata, K., Reed, J. C., Wewer, U. M. and Engvall, E.** (1997). Integrins (alpha7beta1) in muscle function and survival. Disrupted expression in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **100**, 1870–81.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. and Freeman, W. M.** (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44**, 619–26.
- Venken, K. J. T., Schulze, K. L., Haelterman, N. A., Pan, H., Evans-holm, M., Carlson, J. W., Levis, R. W., Spradling, A. C., Hoskins, R. A. and Bellen, H. J.** (2011). MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. **8**, 737–743.
- Vigoreaux, J. O.** (2005). Molecular Basis of Muscle Structure. In *Muscle development in Drosophila* (ed. Sink, H.), pp. 1–14. Springer.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U. and Jäckle, H.** (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev. Dyn.* **224**, 403–12.
- Volk, T., Fessler, L. I. and Fessler, J. H.** (1990). A role for integrin in the formation of sarcomeric cytoarchitecture. *Cell* **63**, 525–36.

- Wairkar, Y. P., Fradkin, L. G., Noordermeer, J. N. and DiAntonio, A.** (2008). Synaptic defects in a *Drosophila* model of congenital muscular dystrophy. *J. Neurosci.* **28**, 3781–9.
- Wang, J.** (2012). Pull and push: talin activation for integrin signaling. *Cell Res.* **22**, 1512–4.
- Wang, S. M., Tsai, Y. J., Jiang, M. J. and Tseng, Y. Z.** (1997). Studies on the function of rho A protein in cardiac myofibrillogenesis. *J. Cell. Biochem.* **66**, 43–53.
- Wasser, M., Bte Osman, Z. and Chia, W.** (2007). EAST and Chromator control the destruction and remodeling of muscles during *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* **307**, 380–93.
- Wayburn, B. and Volk, T.** (2009). LRT, a tendon-specific leucine-rich repeat protein, promotes muscle-tendon targeting through its interaction with Robo. *Development* **136**, 3607–15.
- Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jäckle, H., Janning, W. and Klämbt, C.** (2003). FlyMove--a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet.* **19**, 310–1.
- Weitkunat, M. and Schnorrer, F.** (2014). A guide to study *Drosophila* muscle biology. *Methods* **68**, 2–14.
- Weitkunat, M., Kaya-Çopur, A., Grill, S. W. and Schnorrer, F.** (2014). Tension and force-resistant attachment are essential for myofibrillogenesis in *Drosophila* flight muscle. *Curr. Biol.* **24**, 705–16.
- Wen, Y., Makagiansar, I. T., Fukushi, J., Liu, F.-T., Fukuda, M. N. and Stallcup, W. B.** (2006). Molecular basis of interaction between NG2 proteoglycan and galectin-3. *J. Cell. Biochem.* **98**, 115–27.
- White, B. H., Osterwalder, T. P., Yoon, K. S., Joiner, W. J., Whim, M. D., Kaczmarek, L. K. and Keshishian, H.** (2001a). Targeted attenuation of electrical activity in *Drosophila* using a genetically modified K(+) channel. *Neuron* **31**, 699–711.
- White, B., Osterwalder, T. and Keshishian, H.** (2001b). Molecular genetic approaches to the targeted suppression of neuronal activity. *Curr. Biol.* **11**, R1041–53.

- Wolfstetter, G. and Holz, A.** (2011). The role of LamininB2 (LanB2) during mesoderm differentiation in *Drosophila*. *Cell. Mol. life Sci.* **69**, 267–282.
- Wright, T. R.** (1960). The phenogenetics of the embryonic mutant, lethal myospheroid, in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* **143**, 77–99.
- Wu, H., Xiong, W. C. and Mei, L.** (2010). To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* **137**, 1017–33.
- Xiong, J., Wang, Y., Zhu, Z., Liu, J., Wang, Y., Zhang, C., Hammes, H.-P., Lang, F. and Feng, Y.** (2007). NG2 proteoglycan increases mesangial cell proliferation and extracellular matrix production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 960–7.
- Yarnitzky, T., Min, L. and Volk, T.** (1997). The *Drosophila* neuregulin homolog *Vein* mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells. *Genes Dev.* **11**, 2691–700.
- Yurchenco, P. D., Amenta, P. S. and Patton, B. L.** (2004). Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol.* **22**, 521–38.
- Zammit, P. S., Partridge, T. A. and Yablonka-Reuveni, Z.** (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem. Cytochem.* **54**, 1177–91

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de esta tesis doctoral son muchas las personas que me han ayudado de un modo u otro. Gracias a ellos he podido llegar hasta aquí, y gracias a ellos puedo decir que esta etapa ha merecido muchísimo la pena, tanto a nivel personal como profesional. Esperando no olvidarme de nadie, estas son las personas que me han ayudado y a las que les estoy enormemente agradecido:

A Bea por haber sido una estupenda directora de tesis. Por lo fácil que es trabajar contigo, y por lo mucho que he aprendido en nuestras discusiones sobre ciencia. También por tu paciencia y confianza, que me han permitido dar lo mejor de mí. Agradecerte sobre todo, tu amistad. Desde que llegué a Sevilla me sentí acogido, y eso ha sido en gran parte gracias a ti.

A Lola. Por todo lo que me has enseñado, por contagiarme tu optimismo y ayudar tanto en los momentos más críticos (estos alemanes...). Gracias por estar siempre ahí. Durante todo este camino ha sido un placer disfrutar de tu buen humor y tu alegría.

A Acaimo. Sin duda, ha sido un privilegio tenerte cerca durante esta tesis. Siempre dispuesto a ayudar y compartir tu experiencia, y siempre contagiando pasión por la ciencia.

A Alice, por tu cabecita privilegiada que tanta ciencia guarda, por tu risa perpetua, y por que hablar contigo siempre es interesante. Por tus historias, que siempre me fascinan. Me ha encantado tenerte en el laboratorio.

A Andrea, rayito de sol que ayuda a todos. Ni mil agobios te quitan la sonrisa. Contigo se está más agustico en el laboratorio, y tus historias gallegas como la de gatocan las recordaré siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Alfon luz, que tiene un corazón más grande que el CABDddd. Ha sido un placer aguantar tus penas y más penas (tan divertidas a veces), porque sin duda, al final, das alegría a todo el que te rodea. Fuiste mi guía en los inicios de esta aventura. Algo más de 4 años después, eres una gran amiga. Que suerte haberte tenido de compañera en el laboratorio.

A Besa, un verdadero currante. Gracias por ser un torrente de alegría para el laboratorio. Y por que sé que siempre estas ahí, dispuesto para lo que haga falta.

A Clara, por tu ayuda constante y enorme en este trabajo. Por su simpatía sevillana 100% (y eso no es ná malo, ser del Betis sí), y por intentar que bailara bien cada feria (fracaso total). Solo lamento no haberte tenido al lado más tiempo.

A Juan, por ser tan servicial y preocuparse por todos. Por alegrar la mañana con un saludo sincero. Y por hacerme sentir que estás ahí para lo que necesite.

A Mari Carmen, erudita del laboratorio y siempre dispuesta a ayudar. Contigo siempre se pueden echar unas risas, incluso cuando estamos en las cloacas más profundas. No solo me has ayudado mucho, sino que me lo he pasado genial con tus bromas (menos la de pegarme hasta el alma a la mesa, o la de pegarme a mi a secas cada dos por tres, o tantas otras... porque eran bromas, ¿verdad?). Sabes de sobra que has sido una de las personas más especiales con las que he compartido este tiempo. Imaginándonos en una sucia taberna llena de criaturas deleznales, brindemos por ello.

A Mari Chús, una maquina en el laboratorio y además la amiga perfecta: te gusta el fútbol, el campo, los juegos de mesa, comer cangrejo, vivías en Dos Hermanas, cuando te ofuscas te pones roja y echas humillo (bueno casi)... y coges y te vas de Postdoc. Ya te vale. Me habría encantado tenerte por aquí más tiempo, y te he echado de menos desde que te fuiste. Pero me alegra saber que nos seguiremos viendo.

A María, por su sentido del humor infinito y por su sonrisa contagiosa. Porque trabajar con gente tu hace que te ilusiones con ir al laboratorio hasta los Lunes más tristes.

A Sesi, la manchega del laboratorio. No lo parece (no lo pareces Ceci, a ver que le hacemos) pero es más güena y más simpática que tó. Me he reído contigo a más no poder, y espero seguir haciéndolo en el futuro. Gracias por tu sentido del humor tan agradecido, tan muchachada. Por nuestras mañanas ermitañas y nuestras tardes de risa fácil. Y por que tengo una amiga a la que seguir visitando. Si es que no somos nadie Sesi, pero tu vas a llegar mu lejos.

A tanta gente que ha pasado por el laboratorio y que de algún modo me han ayudado. A John, importantísimo durante mi desembarco. Siempre dispuesto a ayudar y explicar. A Fati, que me dio amistad en los inicios y me ayudó en el laboratorio. A Mari Jose, con la que siempre pude echar unas risas cuando lo necesitaba. A Inka, que siempre me dio ánimos y creyó tanto en mí. A Antonio Jesús, pupilo fugaz y aventajado. El futuro sanador de caballos. A las nuevas del 111, Carmina y Gema, que me habéis pillado en mi momento más “%{çjar”, espero poder compartir todo el tiempo posible con vosotras.

A Casero. He tenido la suerte de tener un casero guapo, eso lo saben todos. Pero sobre todo, he tenido un casero que es un cacho pan, y que siempre está sonriendo. Un amigo. Que pena no haberte tenido más tiempo en Sevilla. La de pelis que podríamos haber visto acurrucados en el sofá, y la de persianas que podríamos haber arreglado juntos. Pero no te preocupes que allá donde vayas iré a verte (¡Pero ya no te vayas más lejos!).

A Mary/Casera. Tu malagueña amistad ha sido crucial para mí estos años, lo sabes bien. Tengo mucho que agradecerte. Hasta me has enseñado a comer cosas de la gente de ciudad ¡Y yo dándote de comer bocas de mar putrefactas y pizzas con tierra! Pero no solo sé que eres de las que está siempre cuando hace falta, también sé que para pasarlo bien y echar unas risas no hay mejor compañía. Que divertido observarte mientras ves pelis agobionas. Y además, como ocurre con Casero, también mu guapa (¡Maya va a causar sensación!).

A la gente del CABD. A el Grapas, el jugador franquicia del CABD. Un crack absoluto. Lo que me he reído contigo. Además espero que nos des trabajo a todos en el futuro. A Tocayo por sus consejos y sus historias. A Calero por alegrarme un congreso en un momento tan

AGRADECIMIENTOS

complicado para mí. A la gente del fútbol de los Martes, que tanto me ha ayudado a desconectar estos últimos meses. A Mari Ángeles por su ayuda desinteresada y urgente. Te deseo mucha suerte. A Miriam, por nuestras conversaciones desahogo mitad penas mitad alegrías. A Fernando y Jaime, por ser unos estupendos tutores de mi trabajo. A Antonella, por estar siempre dispuesta y con una sonrisa para cualquier información o reactivo que necesitara. A Asun, por su ayuda y orientación en la Biología Molecular de estos bichos con los que trabajamos. A Kathy, por su ayuda.

A Nandi, por todo lo que me enseñó. Que esté escribiendo esto es gracias a que te encontré en el camino. Todo lo que consiga es en gran parte debido a ti. A nivel personal, me alegro mucho de poder seguir teniéndote cerca y contar con tu amistad.

A Ignacio, por procurarme la banda sonora de esta tesis. Siempre es un placer escucharte y aprender de ti.

A la gente del laboratorio de Málaga. A Eva, por ayudarme siempre cuando compartíamos laboratorio y por seguir ahí. A JJ falso, por arrancarme una sonrisa con solo recordarte y por lo mucho que intentaste enseñarme (los dos sabíamos que estabas perdiendo el tiempo). A Vicky, por criarme en el laboratorio. A Paco, por la oportunidad. Y gracias a Said, Canales, Vane, Sara, Marina, Pepi, Reme y Arantxa, que también me ayudaron y acompañaron.

A Blanca, por lo mucho que ayudó y apoyó en los inicios en este mundillo. Te deseo lo mejor y que consigas muchos éxitos.

A Miriam, Elena y el Abuelo, que me han demostrado amistad cuando más la necesitaba y cuando menos podía esperarla.

A Kiko, compañero de vértigos y de sueños. Siempre te siento cerca, siempre cuento contigo. Eres un crack. Espero que llegues tan lejos como Ross Geller.

A Iznate, porque cuando miro atrás y pienso quien me acompañó al principio de esta aventura siempre me acuerdo de ti. Eres un monstruo.

A Carlos de Sola, por su cercanía y porque sin el no podría haber hecho este trabajo.

A mis amigos, los que aguantan carros y carretas de la amistad más dejada y perra que se pueda imaginar, y que siguen ahí inmutables. Los que habitáis Vélez, el Cañuelo, Madrid o Andújar.

A mis amigos Carmonenses Luis, José y Fernando, que me han acogido como uno más, y con los que he compartido momentos inolvidables durante estos años. Especialmente a Luis, que ha estado más cerca, y con el que siempre tengo garantizadas unas risas.

Fernando, Mari y Brocheta, por darme un hogar en Sevilla, donde he podido sentirme en casa, en familia. Donde he podido desconectar y reponer fuerzas.

A Tomás y Maru, que de manera ciega e implacable siempre creen en mí, y siempre me empujan hasta la meta. A Antonio y Remedios, por su apoyo e ilusión en cada pasito que doy. A Pilar y Juanma por estar siempre ahí y darme tantas fuerzas, aunque ellos no se den ni cuenta. A mi pandilla catalana (Manolo, Pepi, Juanjo el pelota, Laura, Manolín, María y Julia) que me han dado tanta alegría, y a los que siento tan cerca.

A Bea, que me acompaña a cada paso. Por aguantar mis horas más oscuras con una sonrisa. Por luchar para mantenerme a flote. Por escuchar mis delirios científicos. Por la aventura que vivo cada día a tu lado.

Anexo

RESEARCH ARTICLE

The conserved transmembrane proteoglycan Perdido/Kon-tiki is essential for myofibrillogenesis and sarcomeric structure in *Drosophila*

Juan J. Pérez-Moreno¹, Marcus Bischoff^{2,*}, Maria D. Martín-Bermudo¹ and Beatriz Estrada^{1,‡}

ABSTRACT

Muscle differentiation requires the assembly of high-order structures called myofibrils, composed of sarcomeres. Even though the molecular organization of sarcomeres is well known, the mechanisms underlying myofibrillogenesis are poorly understood. It has been proposed that integrin-dependent adhesion nucleates myofibrils at the periphery of the muscle cell to sustain sarcomere assembly. Here, we report a role for the gene *perdido* (*perd*, also known as *kon-tiki*, a transmembrane chondroitin proteoglycan) in myofibrillogenesis. Expression of *perd* RNAi in muscles, prior to adult myogenesis, can induce misorientation and detachment of *Drosophila* adult abdominal muscles. In comparison to controls, *perd*-depleted muscles contain fewer myofibrils, which are localized at the cell periphery. These myofibrils are detached from each other and display a defective sarcomeric structure. Our results demonstrate that the extracellular matrix receptor *Perd* has a specific role in the assembly of myofibrils and in sarcomeric organization. We suggest that *Perd* acts downstream or in parallel to integrins to enable the connection of nascent myofibrils to the Z-bands. Our work identifies the *Drosophila* adult abdominal muscles as a model to investigate *in vivo* the mechanisms behind myofibrillogenesis.

KEY WORDS: Myogenesis, Muscle, Myofibril, Sarcomere, Integrin, Chondroitin sulfate proteoglycan, Perdido, Kon-tiki, CSPG4, MCSP, AN2, NG2

INTRODUCTION

The study of muscle development and maintenance is crucial for better understanding the basis of myopathies. Muscle development is a multistep process that is conserved across the animal kingdom. It starts with the specification of muscle precursor cells, the myoblasts, which either fuse to each other to form the multinucleated muscles or differentiate into cardiomyocytes. While fusion is taking place, muscles migrate and attach to tendon cells. Then, at late stages during muscle morphogenesis, final differentiation of the muscles takes place by the assembly of myofibrils (Schejter and Baylies, 2010; Schweitzer et al., 2010).

Muscles contain dozens of myofibrils, which are rod-like structures composed of the repetition of the basic functional unit of the muscle: the sarcomere. Sarcomeres are contractile units composed of interconnected thin (actin) and thick (myosin) filaments and several associated proteins, including Tropomyosin, Troponin, Titin, Zasp, CAPZ and α -actinin, among others. Myofibrillogenesis is initiated by the formation of a regular array of sarcomeres, which later on grow in width and, in some cases, in length. Contiguous sarcomeres attach to each other by the crosslinking of their thin filaments to actin-binding α -actinin at the so-called Z-disc. Thus, the Z-discs hold the sarcomeres in register as the muscles contract and prevent them from coming out of alignment when muscles stretch (Katzemich et al., 2012). Thick filaments are also crosslinked to each other in the middle of the sarcomere at the M-line. Myofibrils are connected to other components of the cell cytoskeleton and internal organelles, such as the transverse tubules, sarcoplasmic reticulum and microtubules, as well as to each other. Peripheral myofibrils are also connected to the sarcolemma (cell membrane) and to the extracellular matrix (ECM) at specialized integrin adhesion sites called costameres (Ervasti, 2003). In addition, myofibrils termini also attach to the skeleton through integrins at the so-called myotendinous junction (Sanger et al., 2005; Sparrow and Schöck, 2009).

Studies in tissue culture and genetic model organisms have shed light onto the genetic, cellular and molecular basis of myofibril assembly (Sanger et al., 2005; Sparrow and Schöck, 2009; Rui et al., 2010). There are two prominent models for myofibrillogenesis. In the ‘independent assembly model’, proposed by Holtzer and colleagues, microfilament bundles act as a scaffold during sarcomere assembly (Holtzer et al., 1997). I-Z-I complexes containing actin filaments, α -actinin and Titin are organized in register on these filamentous structures. Full-length myosin thick filaments assemble independently and incorporate in these preformed structures (Schultheiss et al., 1990). In the ‘premyofibril model’, proposed by Sanger and co-workers, premyofibrils, which contain transitory arrays of I-Z-I complexes consisting of nonmuscle myosin II and sarcomeric actin attached to precursors of Z-discs (Z-bodies) rich in α -actinin, form at the periphery. Premyofibrils develop into mature myofibrils concurrent with a replacement of non-muscle myosin II by muscle myosin II. Then, Z-bodies grow and align longitudinally in the future Z-disc through a contractility-dependent maturation. As maturation proceeds, many myofibrils are displaced to the interior while being connected to each other by the inter-Z-disk bridges (Rhee et al., 1994). In an extension of the premyofibril model, integrin adhesion sites (IAS) are proposed to be key in nucleating the first components of myofibrils (Sparrow and Schöck, 2009). In this scenario, IAS, also called protocostameres,

¹Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC, 41013 Seville, Spain. ²Department of Zoology, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge, CB2 3EJ, UK.

*Present address: Biomedical Sciences Research Complex, University of St Andrews, North Haugh, St Andrews, Fife KY16 9ST, UK.

‡Author for correspondence (bestmar@upo.es)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

act as nucleation sites for α -actinin recruitment, which then causes the assembly of premyofibril-associated Z-bodies. This model is based on genetic evidence from several model organisms including mice, *Drosophila* and *C. elegans* (reviewed in Sparrow and Schock, 2009). In all of them, integrins are required for sarcomere assembly and Z-disc formation. Furthermore, in *Drosophila* and *C. elegans*, integrins are the most upstream components in myofibril assembly. However, despite this crucial role for integrins in myofibrillogenesis, the mechanisms by which integrins get localized and act in coordination with other important proteins during myofibrillogenesis remains unclear.

The *Drosophila* adult muscles have proven to be an excellent model system to study the genetic, cellular and molecular basis of myogenesis (Chen and Olson, 2004; Beckett and Baylies, 2006). Morphologically, there are two major muscle types in the *Drosophila* adult: fibrillar muscles, which are present exclusively as indirect flight muscles, and tubular muscles, which include the jump, leg and abdominal muscles (Peckham et al., 1990; Schönbauer et al., 2011). In this work, we used the adult abdominal muscles as our model system to study adult myogenesis *in vivo*. The abdominal muscles are located just beneath the epidermis, so they are accessible to microscopic visualization, and are amenable to genetic analysis. Adult abdominal muscles develop *de novo* during metamorphosis from pools of myoblasts present in the larva. Proliferating myoblasts are in close contact with abdominal nerves and migrate out across the developing abdominal epidermis. This migration is followed by myoblast fusion and segregation into cell groups to form multinucleated muscle precursors. Muscle precursors migrate at both ends to find and attach to their tendon cells located in the overlying ectoderm (Currie and Bate, 1991; Dutta et al., 2005; Krzemien et al., 2012). At this point, muscle differentiation starts with the newly developed myofibers entering in the hypertrophic phase of growth, where the muscle volume increases owing to massive expression of structural genes and the assembly of the contractile apparatus.

The gene *perdido/Kon-tiki* (*perd*) is expressed in muscles and it is required for the development of the embryonic myotendinous junction. *perd* encodes a conserved single-pass transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, an adhesion protein ortholog of the mammalian receptor CSPG4. *Perd* contains laminin globular extracellular domains and a small intracellular domain with a C-terminal PDZ-binding consensus sequence (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). In addition, *perd* genetically interacts with integrins during embryonic myogenesis (Estrada et al., 2007). Interestingly, *perd* mutants are embryonic lethal, even though the muscle detachment phenotype affects only a subset of the embryonic muscles. In order to investigate possible additional functions of *perd* during myogenesis, we have studied its function in the context of adult fly muscles.

Here, we have identified *Perd* as a key regulator of myofibrillogenesis in the *Drosophila* adult abdominal muscles. We show that the expression of *perd*-specific RNA interference (RNAi) constructs in the muscles before adult myogenesis starts can induce misorientation and detachment of *Drosophila* adult abdominal muscles, a phenotype similar to the one described in the muscles of *perd* mutant embryos. In addition, *perd*-depleted muscles contain fewer myofibrils than control muscles. The few remaining myofibrils found in *perd*-depleted muscles localize at the periphery of the cell, are detached from each other and present a defective sarcomeric structure. We propose that the ECM

receptor *Perd* has a specific role in the assembly of myofibrils and in sarcomeric organization. In our model, *Perd* acts downstream or in parallel to integrins to enable the connection of nascent myofibrils to the Z-bands. In addition, our work presents the *Drosophila* adult abdominal muscles as a new genetically tractable model to investigate *in vivo* the cellular and molecular mechanisms of myofibrillogenesis.

RESULTS

Perd is required for the development of adult muscle fibers

Given the role of *Perd* during embryonic muscle morphogenesis (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007), we decided to analyze *Perd* function in adult myogenesis. To this end, we used the GAL4/UAS system to express *perd*-specific RNAi lines starting from the larval period, prior to adult abdominal myogenesis, in larval myoblasts (Bate et al., 1991; Brand and Perrimon, 1993; Dietzl et al., 2007). We utilized the Mef2-GAL4 driver to express two UAS-*perd* RNAi lines, JF01159 and 106680, which target exons present in all known *perd* isoforms (Fig. 1A; Flybase). Quantification of *perd* mRNA levels showed that, although expression of the 106680 line reduced the mRNA levels by 80.4% relative to the controls, line JF01159 was less efficient, as it decreased *perd* mRNA levels by only 17% (Fig. 1B).

Knocking down *perd* by expressing the 106680 line in the thoracic indirect flight muscles causes a strong muscle detachment phenotype and the rounding of the muscles (data not shown), similar to the phenotype in *perd* mutant embryos. The rounded shape of these muscles obstructs the study of muscle morphogenesis and subsequent differentiation, as sarcomeric proteins collapse at the center of the muscle (Rui et al., 2010). Thus, we turned to the analysis of abdominal muscles, which are less affected by *perd* knockdown and can maintain some morphological features. The dorsal abdominal musculature contains two types of muscles, the dorsal abdominal adult muscles and a set of persistent larval muscles (PLMs). Both types of muscles are oriented along the anterior–posterior axis and attach to tendon cells in the overlying epidermis (Bate et al., 1991; Krzemien et al., 2012) (Fig. 1D). We found that the expression of either of the *perd* RNAi lines in myoblasts from the larval period onwards prevented the eclosion of young adults from the pupal cage. This process requires muscle contraction, including that of the PLMs. Consistent with this, PLMs from Mef2-GAL4>UAS-*perd* RNAi abdomens (hereafter referred to as *perd*-depleted abdomens) were always detached and formed myospheres (Fig. 1E,F). This mutant phenotype was less conspicuous in the dorsal abdominal muscles, which required the co-expression of *perd* RNAi lines with Dicer to induce muscle detachment (supplementary material Fig. S1A). Thus, consistent with its role in the embryo, *Perd* is also required for muscle attachment in the adult. In addition to the above phenotypes, *perd*-depleted abdomens always displayed an abnormal uneven distribution of muscles, rendering abdomen areas devoid of muscles (Fig. 1F, see below). Interestingly, the adult abdominal muscles were often misoriented and thinner (Fig. 1C,E,F; supplementary material Fig. S1A). As expected, the phenotypes due to expression of line 106680 were stronger than those obtained with line JF01159 (Fig. 1E,F). Thus, from now on, we will refer only to the results obtained with line 106680. In order to validate these results we expressed the line 106680 under the adult-muscle-specific 1151-GAL4 line. These abdomens presented misoriented dorsal abdominal muscles, which were

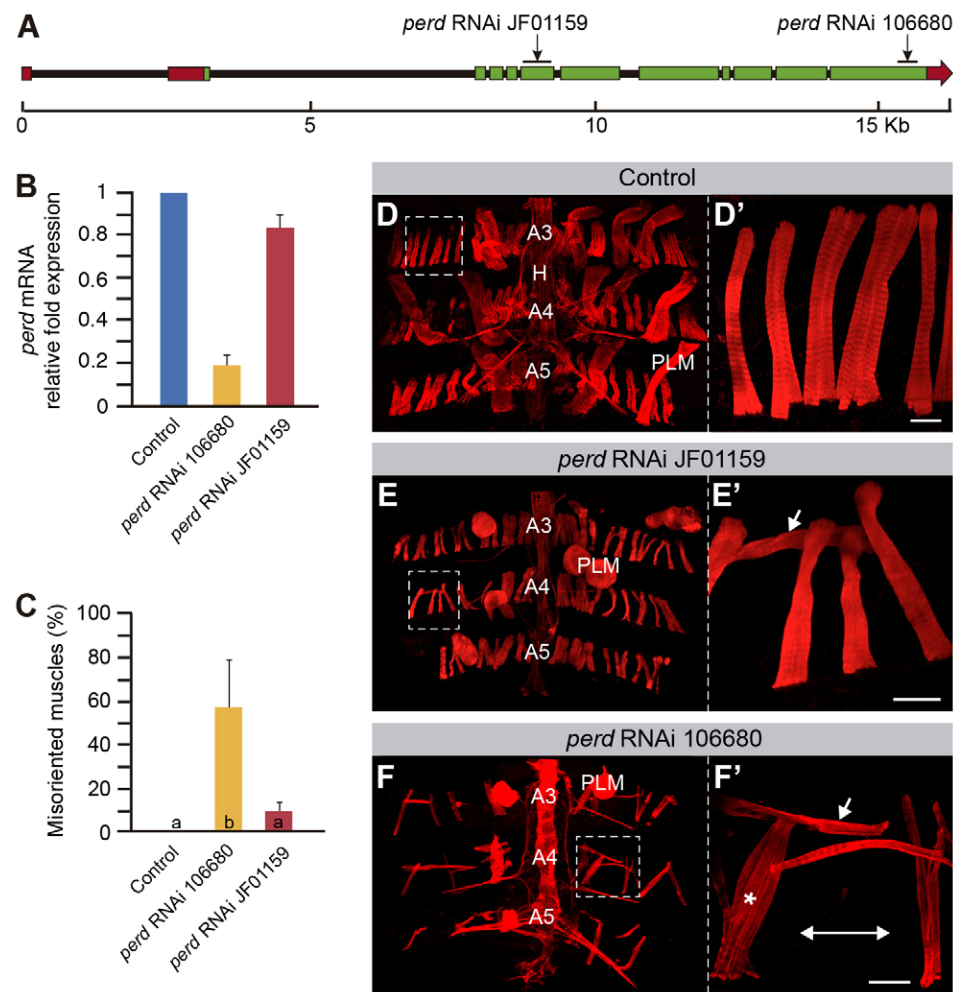


Fig. 1. *perd* RNAi expression causes defective adult muscle development.

(A) Schematic representation of the *perd* genomic region. The sequences targeted by the two RNAi constructs used are indicated. UTR sequences are represented in red, and the exons in green. Black lines represent the introns. (B) Quantitative PCR data shows that expression of either of the two RNAi constructs results in a reduction in *perd* mRNA levels, with the 106680 construct being more efficient (means \pm s.d., $n=2$). (C) Quantification of the percentage of misoriented dorsal abdominal muscles per hemisegment (means \pm s.d., $n=9$). Bars labeled with different letters indicate statistically significant differences. (D–F') Confocal micrographs of control muscles (D, D'), and muscles expressing RNAi against *perd* (E–F') labeled with Rhodamine-Phalloidin (red). D', E' and F' are magnifications of the white boxes in D, E and F, respectively. (D, D') At 80–100 hours APF, control dorsal abdominal muscles orient parallel to the anterior–posterior axis and are homogeneously distributed along the abdominal segment. (E–F') Expression of either of the *perd* RNAi constructs results in misoriented dorsal abdominal muscles (arrows) and complete detachment of the PLM. (F, F') In addition, expression of the RNAi 106680 construct causes abnormal distribution of the dorsal abdominal muscles with regions devoid of muscles (double arrow) and muscle bundles (asterisk). These muscles are thinner than the controls. A3, A4 and A5 indicate the corresponding abdominal segments. H, heart. Scale bars: 20 μ m.

thinner than the controls and formed muscle bundles (supplementary material Fig. S1B), similar to those in *Mef2-GAL4>UAS-106680* abdomens (Fig. 1F).

Perd is required for proper adult muscle targeting and segregation

To study the muscle phenotypes of *perd*-depleted abdomens in more detail, we analyzed *in vivo* muscle migration. In control abdominal muscles, unfused adult myoblasts start migrating at 13 hours after puparium formation (APF) from lateral positions of the pupal abdomen along the dorsal nerve towards the midline (supplementary material Movie 1). This movement takes place underneath the overlying migrating epidermis. Later, myoblast fusion occurs at 20 to 26 hours APF, while migration continues. Myoblasts then coalesce into small groups that form the anlagen of individual muscle fibers and align parallel to one another in an anterior–posterior direction. At 33 hours APF most muscles are already properly segregated and oriented (Bate et al., 1991) (Fig. 2A; supplementary material Movie 1). *In vivo* analysis of myoblast migration in *perd*-depleted abdomens showed that, by 26 hours APF, some muscles failed to arrange along the anterior–posterior axis, so that by the end of myogenesis more than 50% of the muscles were abnormally oriented (Fig. 1F, Fig. 2B; supplementary material Movie 2). In addition, *perd*-depleted muscles failed to segregate from each other and arrange into muscle bundles,

suggesting that the grouping of myoblast into discrete pools to individualize the different muscles is affected upon *perd* depletion (Fig. 1F; Fig. 2B; supplementary material Movie 2). Taken together, these results show that *perd* is also required in the adult to control myogenesis, including muscle attachment, orientation and segregation.

Founder myoblast number and myoblast fusion are normal in *perd*-depleted muscles

As mentioned above, *perd*-depleted abdomens showed gaps in their muscle distribution (Fig. 1F). In order to test whether this was due to a role for *perd* in muscle specification, we quantified the number of muscles per hemi-segment in control and experimental abdomens ($n=9$). We found that silencing *perd* in myoblasts did not affect muscle number (Fig. 3A). Furthermore, given that, like in the embryo, the number of adult abdominal muscles is directly related to the number of founder myoblasts (Dutta et al., 2005), our results suggest that *perd* is not required to specify the correct number of muscles founder cells in the adult abdomen. This is in agreement with results obtained in the embryo where *perd* is not required for founder cell specification (Artero et al., 2003; Estrada et al., 2006; Estrada et al., 2007).

Perd-depleted adult abdominal muscles were thinner than wild-type muscles (Figs 1, 3). In the adult fly, as it is the case during embryogenesis, muscles form by myoblast fusion. In this

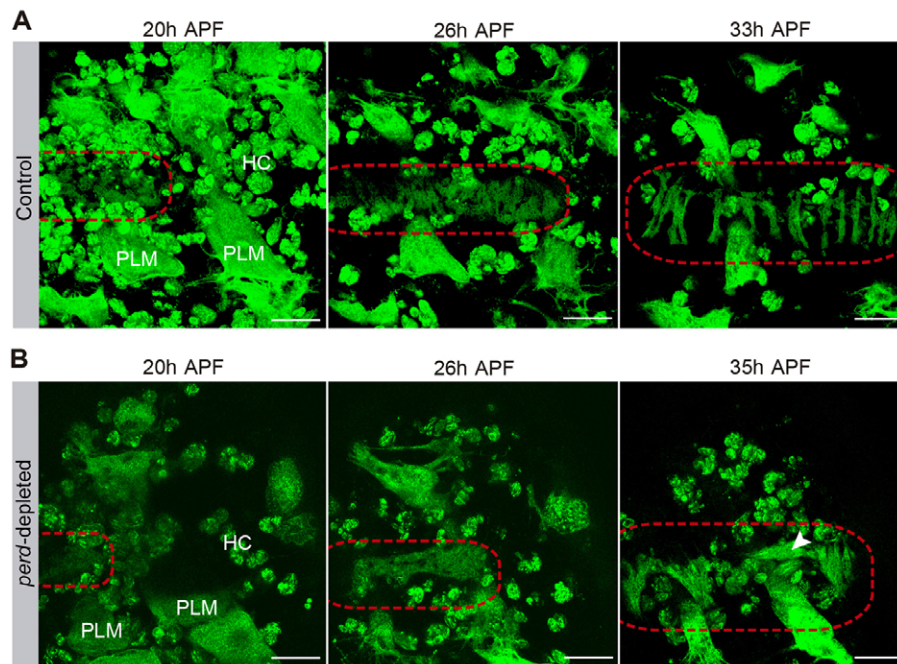


Fig. 2. *In vivo* analysis of control and *perd*-depleted adult muscles.

Stills taken from live imaging of control adult myoblasts (A) and myoblasts expressing *perd* RNAi 106680 (B) ($n=7$). Larval, adult abdominal muscles, and hemocytes are labeled with mCD8–GFP. Muscles of the second abdominal segment are shown. See cartoon at the right of the panel for illustration. (A) From 20 to 33 hours APF, control pupae adult myoblasts migrate, orientate along the anterior–posterior axis and separate into individual muscle fibers. (B) *perd*-depleted adult myoblasts are sometimes misoriented (arrowhead) and fail to separate properly. Red-hatched lines indicate the adult myoblasts and the forming muscle fibers. ML, midline; HC, hemocytes. Scale bars: 50 μ m.

process, new myoblasts incorporate into growing muscles allowing them to reach their final size. Thus, the reduced muscle width observed in *perd*-depleted muscles could be due to defective myoblast fusion. To test this possibility, we quantified the number of nuclei per muscle in both wild-type and *perd*-depleted

abdomens. We found that wild-type and *perd*-depleted adult abdominal muscles contained the same number of nuclei, which on average was between eight and eleven (Fig. 3B–D) (Mukherjee et al., 2011). These results show that the abnormal size of *perd*-depleted muscles is not due to fusion defects. However, it is worth

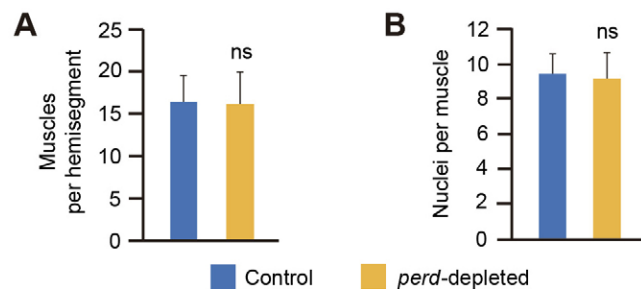
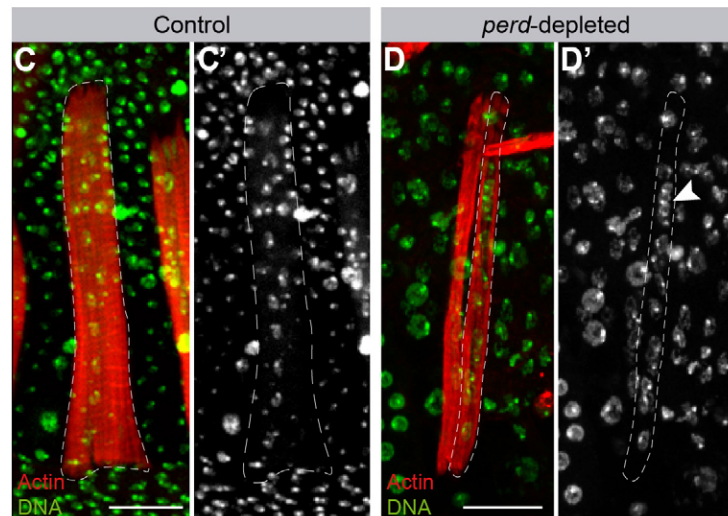


Fig. 3. Reduction of *perd* function does not affect muscle number or number of nuclei per muscle.

Quantification of the number of muscles per hemisegment (means \pm s.d., $n=9$) (A) and nuclei per muscle (means \pm s.d., $n=9$) (B) in wild-type and *perd*-depleted abdomens. ns, not significant. (C,D) Maximum intensity projection of muscles labeled with Rhodamine–Phalloidin (red) and the nuclear marker TO-PRO 3 (green). Non-muscle nuclei are also labeled with TO-PRO 3 but are located outside the muscle lumen. (D) Two *perd*-depleted muscles are shown but only the delineated one is complete and shows all its nuclei. (C) In wild-type muscles, nuclei are evenly distributed along the muscle length. This distribution is affected in *perd*-depleted muscles (arrowhead in D'). Scale bars: 20 μ m.



mentioning here that, although in wild-type abdominal muscles the nuclei were evenly distributed along the muscle length, this was not the case in *perd*-depleted muscles (Fig. 3D). This could reflect an abnormal organization of the muscle cytoskeleton and/or organelles (see below).

Perd is required for myofibril assembly

To identify the cause for the thinner appearance of *perd*-depleted muscles, we measured muscle width at two time points of their development, 50 and 100 hours APF. To this end, we stained abdomens with Phalloidin to visualize filamentous actin, and analyzed orthogonal optical sections of abdominal muscles. We found that the width of wild-type abdominal muscles at 50 hours APF was on average 7.8 μm , whereas at 100 hours APF it was 12.8 μm (Fig. 4A,B,E), demonstrating that, even though the abdominal muscle pattern at 50 hours APF was completed (Bate et al., 1991), muscles sustain significant growth during late pupal development. Tubular muscles contain an internal lumen devoid of actin where nuclei are found (Peckham et al., 1990; Schönbauer et al., 2011). Our studies showed that the lumen was maintained constant in size along development (supplementary material Fig. S2), suggesting that the increase in width found in wild-type muscles was due to an increment in myofibrils and not in lumen diameter (Fig. 4A',B'). Quantification of *perd*-depleted muscles showed that they were thinner than wild-type muscles, as their width at 50 and 100 hours APF was 5.5 and 7.9 μm , respectively (Fig. 4C–E). Interestingly, *perd*-depleted muscles increased their diameter at a much lower rate than the

control ones, as the width of control muscles grows from 50 hours APF to 100 hours APF by 5 μm , whereas that of *perd*-depleted muscles only grew by 2.4 μm . In addition, the lumen perimeter of *perd*-depleted muscles was slightly but significantly larger than the controls at 100 hours APF (supplementary material Fig. S2). Our results strongly suggest that *perd*-depleted muscles are thinner because they contain fewer myofibrils than controls, pointing towards a role for *perd* in adult myofibrillogenesis. To further test the role of *Perd* in myofibrillogenesis, we looked at the pattern of expression of Zasp-GFP (a protein-trap inserted in the genomic locus of the Z-disc-associated protein Zasp66), which has been extensively used to visualize muscle structure (Jani and Schöck, 2007). In wild-type dorsal abdominal muscles, Zasp-GFP showed a transversal banding distribution, reflecting the perfect alignment of sarcomeres from different myofibrils (Fig. 4F). Each band spanned the entire fiber width, from the sarcolemma to the muscle lumen, which was devoid of Zasp-GFP expression (Fig. 4F). Analysis of Zasp-GFP expression in *perd*-depleted muscles showed that, even though the transverse banding pattern was preserved, the bands were thicker and shorter, and were confined to the periphery of the fiber (Fig. 4G). This suggests that the only differentiated myofibrils with a sarcomeric organization present in these muscles were positioned at the periphery of the muscle, close to the sarcolemma. In addition, we observed that Zasp-GFP was present not only in the Z-bands of *perd*-depleted muscles but also in the cytoplasm surrounding their nuclei. This could represent a pool of excess protein owing

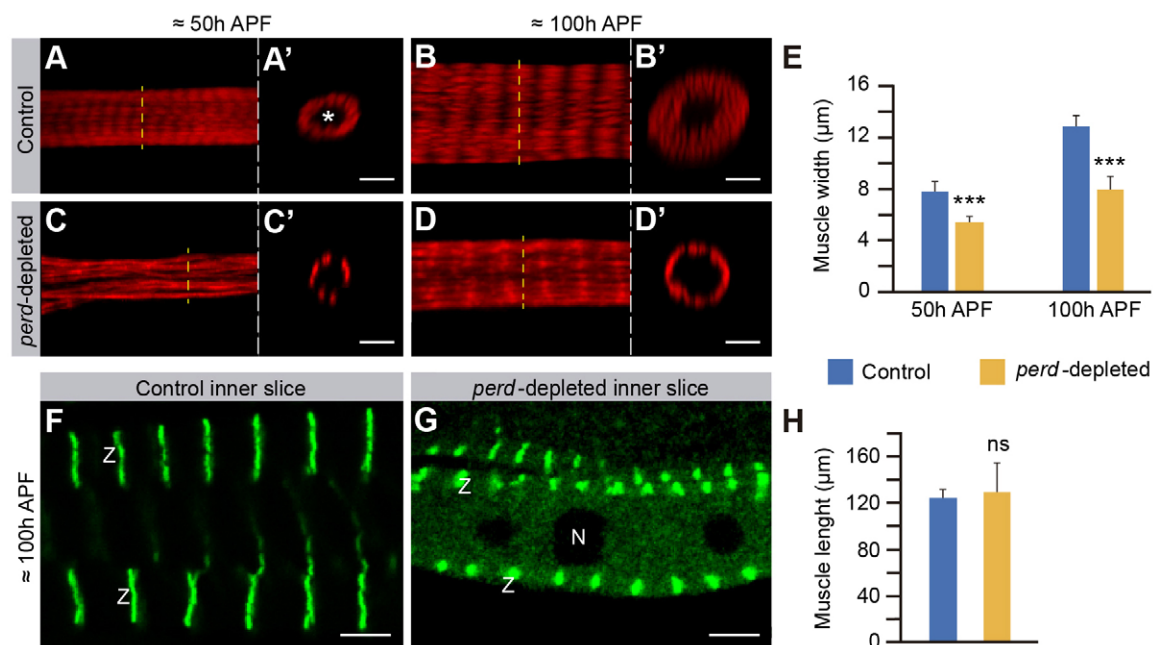


Fig. 4. Myofibril assembly is disrupted in *perd*-depleted muscles. (A–D') Confocal micrographs of muscles at 50 and 100 hours APF stained with Rhodamine-Phalloidin (red). A'–D' show orthogonal confocal cross sections of the muscles in A–D, respectively. The asterisk marks the muscle lumen. (A–B') From 50 to 100 hours APF, control muscles widen by increasing the amount of myofibrils. (C–D') *perd*-depleted muscles are thinner than control at both 50 and 100 hours APF. (E) Quantification of the muscle width of both control and *perd*-depleted muscles at 50 and 100 hours APF (means \pm s.d., $n=27$). Note the *perd*-depleted muscles grow very little compared to control muscles. (F,G) Longitudinal confocal cross sections of the muscles, at 100 hours APF, expressing Zasp-GFP (green) to label the Z-bands (Z). (F) In control muscles, Zasp-GFP is found in bands spanning the fiber width from the sarcolemma to the muscle lumen. (G) These bands are thicker and shorter in *perd*-depleted muscles. In addition, some Zasp-GFP can be seen in the cytoplasm surrounding the nuclei (N). (H) Quantification of the muscle length reveals that *perd*-depleted muscles are as long as controls (means \pm s.d., $n=27$). ns, not significant; *** $P<0.001$. Scale bars: 5 μm .

to a reduced number of assembled myofibrils (Fig. 4G). Finally, despite the width differences, the length of *perd*-depleted muscles was similar to controls (Fig. 4H), showing that *perd* is not required for myofibril elongation. In summary, our results show that *Perd* is required for myofibril organization and differentiation, and thus it is essential for the proper growth of adult abdominal muscles.

***Perd* is required for sarcomeric organization**

The banding distribution of Zasp-GFP in *perd*-depleted abdominal muscles might suggest that *perd* is not absolutely required for sarcomeric organization. To further test this, we analyzed in more detail the distribution of other structures and proteins present in mature sarcomeres in the few myofibrils present in *perd*-depleted muscles. We examined the expression of the Z-disc proteins Zormin and Kettin, and the disposition of the thin and thick filaments. In wild-type abdominal muscles, Zormin and Kettin formed straight lines, owing to the proper alignment and attachment of myofibrils at the Z-bands (Fig. 5B,D) (Bullard et al., 2005; Hudson et al., 2008). In contrast, the Zormin- and Kettin-positive lines in *perd*-depleted muscles were irregular

and discontinued (Fig. 5C,E), reflecting a role for *Perd* in the alignment and attachment between myofibrils. In addition, although Kettin expression extended at both sides of the Z-bands in wild-type muscles, this did not occur in *perd*-depleted muscles (Fig. 5D,E). To visualize the thin and thick filaments, we used Phalloidin and antibodies against myosin heavy chain (MHC), respectively. In wild-type muscles, Phalloidin labeled the sarcomeric actin of the thin filaments, thus highlighting the H-zone that appeared as a region devoid of Phalloidin (Fig. 5A,B). Phalloidin staining of *perd*-depleted muscles showed that the H-zone was absent or very much reduced in these muscles compared to control (Fig. 5C). This was supported by the results obtained from the analysis of MHC distribution in wild-type and *perd*-depleted muscles. In wild-type sarcomeres, there were two bands devoid of MHC staining, a narrow one corresponding to the Z-band and a wider one, known as the bare zone (Tskhovrebova and Trinick, 2003) located within the H-zone (Fig. 5D). In agreement with the results from the Phalloidin staining, we found that the bare zone was absent in *perd*-depleted muscles (Fig. 5E). Overall, the analysis of different sarcomeric proteins shows that *Perd* is required for the proper organization of the sarcomeric structure.

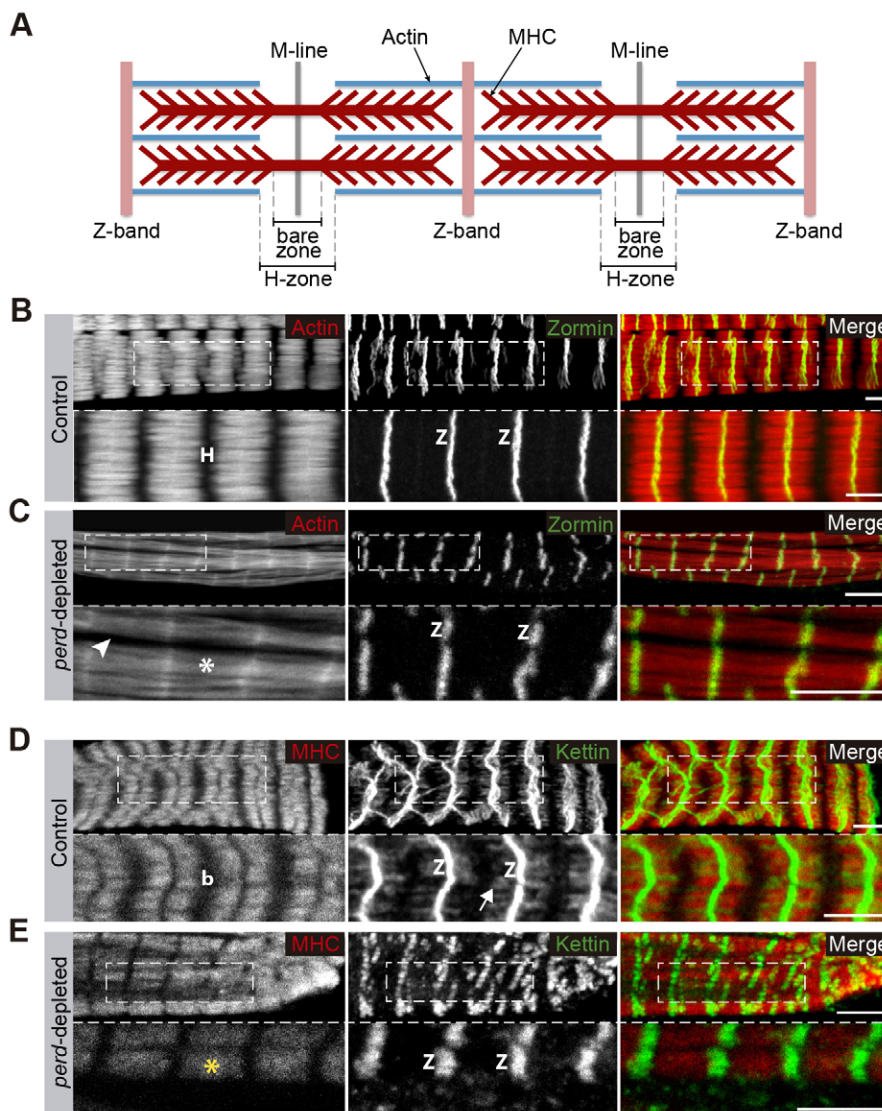


Fig. 5. Sarcomeric structure is affected in *perd*-depleted muscles. (A) Schematic diagram of the sarcomeric structure. (B–E) Confocal micrographs of control (B,D) and *perd*-depleted muscles (C,E). (B,C) Rhodamine-Phalloidin (red) and anti-Zormin antibody (green). In control muscles, the Z-band protein Zormin forms straight lines (B); these are discontinuous and irregular in *perd*-depleted muscles (C). In addition, the H-zone (H), labeled by the absence of Phalloidin in controls (B), is missing in *perd*-depleted muscles (white asterisk in C). Phalloidin staining also shows gaps between myofibrils (arrowhead in C). (D) In control muscles, Kettin is found at the Z-bands and extends towards the central part of the sarcomere (arrow). (E) However, in *perd*-depleted muscles, Kettin is restricted at the Z-bands. In addition, MHC staining (red) reveals that the bare zone (b), contained within the H-zone, is also missing in *perd*-depleted muscles (yellow asterisk). To facilitate sarcomere visualization, the magnified regions are single slices. Z, Z-band. Scale bars: 5 μ m.

Perd function in myofibrillogenesis is independent of its function in myotendinous junction development

Myogenesis is a multistep process where muscle attachment occurs prior to myofibrillogenesis (Sparrow and Schöck, 2009). As many *perd*-depleted muscles showed a reduced attachment area (Fig. 1D',F'; Fig. 3C,D), it is possible that the defects found in myofibrillogenesis were a consequence of aberrant muscle attachment. To test this, we reduced the levels of Perd after muscle attachment was established and analyzed myofibril content in *perd*-depleted muscles that had normal attachment sites. To test this, we expressed *perd* RNAi starting at 30 to 40 hours APF, by which time muscle targeting and attachment have already occurred (Bate et al., 1991). Indeed, this treatment resulted in *perd*-depleted muscles in which the length of the attachment surface was similar to that in control muscles (Fig. 6). Interestingly, we found that the myofibril content, as measured by muscle width, was still compromised in these muscles (Fig. 6B',C). This result suggests that the role of Perd in myofibrillogenesis is independent of its role in muscle attachment sites.

Perd localizes to the muscle tendon attachment and the costameres in adult abdominal muscles

To help us to understand the role of Perd in myofibrillogenesis and sarcomeric organization during adult myogenesis, we studied its expression pattern in adult abdominal muscles. Antibodies against the Perd protein have revealed that Perd localizes at the myotendinous junction in embryonic muscles (Schnorrer et al., 2007). Unfortunately, our attempts to examine the expression of Perd in adult muscles using these antibodies proved inconclusive

owing to inconsistent results and to the weakness of the signal. To circumvent this problem, we used a Perd–HA fusion construct that has been shown to rescue Perd embryonic function (UAS-*kon*-HA) (Schnorrer et al., 2007). When we expressed Perd–HA in adult muscles with the Mef2-Gal4 driver, we found that, in addition to its localization to the myotendinous junction (Fig. 7A), it localized in the sarcolemma in discrete circumferential bands distributed along the muscle length (Fig. 7A). This banding expression in the sarcolemma is in register with the Zormin Z-bands from the underlying myofibrils (Fig. 7A).

Costameres have been suggested to function in the lateral transmission of contractile forces from sarcomeres across the sarcolemma to the ECM (Ervasti, 2003). For this reason, and taking into account the fact that many canonical focal adhesion proteins, such as integrins, Talin, α -actinin and Vinculin, are found in costameres, it has been proposed that costameres are analogous to the focal adhesions found in non-muscle cells (Sparrow and Schöck, 2009). In *Drosophila*, integrins localize to costameres in the adult ventral abdominal muscles (Ribeiro et al., 2011). In order to determine whether Perd–HA localizes to the costameres, we have performed colocalization studies with Perd–HA and integrins. We found that the circumferential expression of Perd–HA indeed colocalized with the costameric marker β PS integrin (also known as Myospheroid) (Fig. 7B). Furthermore, genetic studies in *Drosophila* and in *C. elegans* have highlighted a key role for integrins in myofibril assembly (Volk et al., 1990; Hresko et al., 1994; Bloor and Brown, 1998). Thus, we next decided to test possible interactions between *perd* and integrins.

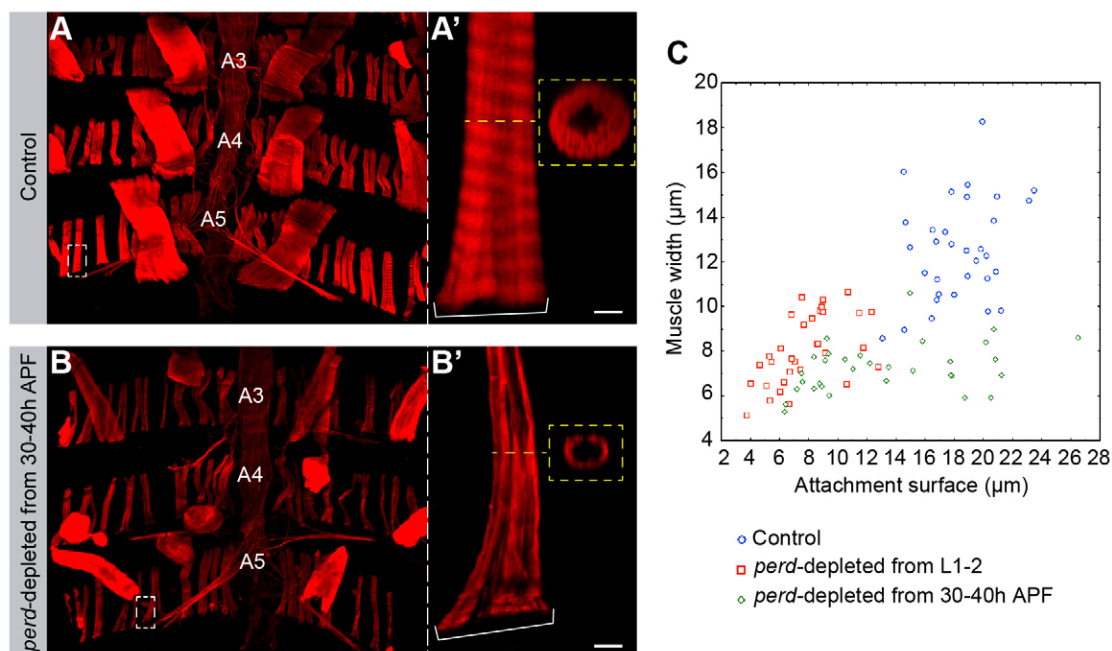


Fig. 6. An independent role for Perd function in myofibrillogenesis. (A–B') Confocal micrographs of muscles stained with Rhodamine–Phalloidin (red) at the end of pupal development. Dotted lines and white brackets indicate muscle width and attachment surface, respectively. (A) Control dorsal abdominal muscles. (A') Magnification of a control muscle showing its muscle attachment surface and its width, which can also be seen in the cross section in A'. (B) *perd*-depleted abdomens, where RNAi was induced starting at 30–40 hours APF, once the muscle migration has finished and the muscle attachments have been established. (B') Magnification of a *perd*-depleted muscle. Note that this muscle is thinner even though it has an attachment surface similar to the control. A cross-section of this muscle shows that it contains less myofibrils than the control. (C) Scatter plot of muscle widths (y-axis) in relation to their attachment surface (x-axis) in control muscles, in muscles where *perd*-RNAi was expressed starting from larval (L) period 1 to 2, and in muscles where *perd*-RNAi was expressed starting from 30 to 40 h APF. A3, A4 and A5 indicate the corresponding abdominal segments. Scale bars: 5 μm.

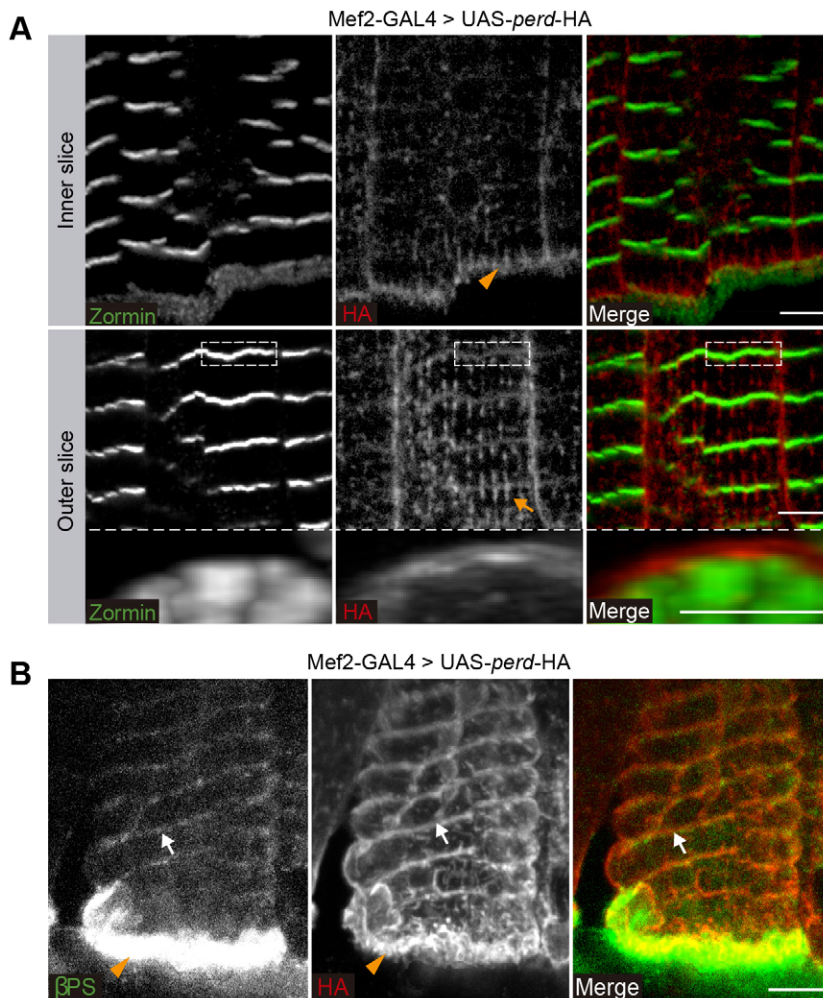


Fig. 7. Perd localizes at muscle attachment sites and costameres. (A) Confocal micrographs of muscles expressing an HA-tagged Perd protein (tub-GAL80ts/+; Mef2-GAL4/UAS-perd-HA) stained for HA (red) and Zormin (green). Inner slice: an internal cross-section of these muscles reveals that, although Zormin localizes to Z-bands, HA-tagged Perd is mainly found at muscle attachment sites (orange arrowhead). Outer slice: an external cross-section showing that HA-tagged Perd also localizes in discrete circumferential bands that juxtapose the Zormin Z-bands (white dotted rectangle). Orthogonal cross section of this region (white dotted rectangle) showing that Perd surrounds the myofibrils. Perd is also found in perpendicular stripes to the Z-bands, parallel to the longitudinal axis of the muscle (orange arrow). (B) Confocal micrographs of muscles expressing HA-tagged Perd protein stained for HA (red) and βPS integrin (green). HA-tagged Perd colocalizes with βPS at both the attachment site (orange arrowhead) and the costameres (white arrow). Scale bars: 5 μm.

Perd can function independently of integrins

A series of experiments have highlighted a role for integrins in myofibrillogenesis in *Drosophila*. Cell culture experiments using myotubes derived from *Drosophila* embryonic gastrula cells have shown that βPS integrin localizes to the Z-bands. In addition, myotubes derived from βPS mutant embryos undergo fusion but fail to form stable Z-bands (Volk et al., 1990). Furthermore, ultrastructural analysis of somatic and hindgut muscles has revealed that βPS mutant muscles lack defined Z-bands (Volk et al., 1990). Finally, muscles from embryos carrying an amorphic mutation in the αPS2 integrin (also known as Inflated) do not contain intervening H-zones (Bloor and Brown, 1998). Thus, as some of the integrin phenotypes resembled those here described for *perd*, one possible mechanism by which Perd could regulate proper myofibrillogenesis and sarcomeric organization is through the regulation of integrin localization. To test this hypothesis, we analyzed whether integrins were properly localized in *perd*-depleted muscles. As was the case for the abdominal PLMs, βPS localized at the muscle-attachment sites and at costameres in wild-type adult dorsal abdominal muscles (Fig. 8A) (Ribeiro et al., 2011). This localization was not affected in *perd*-depleted muscles (Fig. 8B). Furthermore, Talin, a core component of integrin adhesion sites, which is also found at muscle attachment sites and Z-bands, localized normally in *perd*-depleted muscles (supplementary material Fig. S3). These results showed that Perd was not required for proper localization of focal

adhesion proteins at muscle attachment sites and costameres, and suggests that Perd might function independently of integrins during adult myofibrillogenesis.

DISCUSSION

The universal nature of myogenesis suggests that common molecular mechanisms underlie this biological process. Myogenesis leading to the formation of the *Drosophila* adult muscles provides a promising, yet still quite unexplored, system in which conserved molecules regulating this process can be identified and characterized. Here, we present the adult abdominal muscles as an ideal model system to unravel new mechanisms underlying muscle morphogenesis in general, and myofibrillogenesis in particular. Using this system, we have studied the role of Perd, a conserved ECM receptor, in adult muscles. We show that, as it is the case in the embryo, Perd is required for muscle guidance and attachment in adult abdominal muscles. In addition, our results uncover a new function for Perd in myofibrillogenesis and sarcomeric organization.

A major finding of our study is that Perd performs an essential role during adult fly myogenesis, which is crucial for the growth of muscle fibers through myofibril assembly. This requirement is highly specific to the myofibrillogenesis process, as other features in adult myoblast development, such as myoblast fusion or specification of founder cells, appear unaffected when the levels of *perd* are reduced. In addition, although Perd is required

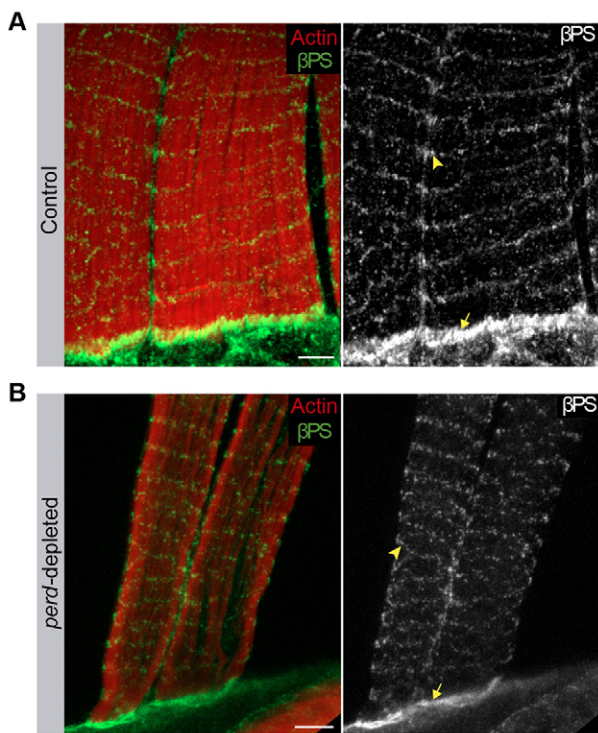


Fig. 8. Integrins localize properly in *perd*-depleted muscles.

(A,B) Confocal micrographs of control (A) and *perd*-depleted muscles (B) stained for Rhodamine–Phalloidin (red) and βPS integrin (green). (A) In control muscles, the βPS integrin localizes at the costameres (arrowhead) and at muscle attachment sites (arrow). (B) This localization is not affected in *perd*-depleted muscles. Scale bars: 5 μm.

for muscles to properly attach to tendon cells, another key step during myogenesis, we show here that the role of Perd in myofibrillogenesis is independent of its role in muscle attachment. It is interesting to note that Perd muscle detachment can affect all dorsal adult muscles and only affects a subset of the embryonic muscles (Estrada et al., 2007; Schnorrer et al., 2007). We hypothesize that this could be owing to the fact that all dorsal abdominal muscles from a segment are morphologically and functionally similar. In contrast, each embryonic muscle is unique in its morphology, size, attachment sites and innervation, and might have different requirements for the gene *perd*.

Studies in mice, *Drosophila* and *C. elegans* have highlighted an essential role for integrins in myofibril assembly *in vivo* by regulating sarcomeric assembly and Z-disc formation. Furthermore, integrins have been proposed to act as starting points for sarcomere assembly by initiating the assembly of actin filaments at the muscle membrane (Sparrow and Schöck, 2009). However, analysis of sarcomere organization in *Drosophila* embryos lacking integrins, have shown that the association of actin and α-actinin can occur in the absence of integrins. This has led to the proposal of a new model for integrin function in myofibrillogenesis in which integrins and other protein complexes, such as Zipper, Zasp, α-actinin, the I-Z-I complex, troponin–tropomyosin and MHC, assemble independently prior to sarcomere formation. Subsequently, integrins act as anchor points for the floating I-Z-I complex and provide tension that allows the interdigitation of thin and thick filaments for *de novo* sarcomere assembly. This, in turn, might facilitate the localization of

integrins on the cell membrane with a given periodicity (Rui et al., 2010). We show here that Perd localizes at the sarcolemma at the level of the Z-bands and that integrins and associated proteins, such as Talin, localized correctly in *perd*-depleted muscles. In addition, we show that initial myofibrillogenesis takes place in these muscles. From these results, we propose that Perd acts once integrins have anchored the initial sarcomeric protein complexes to the surface of the muscles. In this scenario, Perd could be required, downstream or in parallel to integrins, for either the correct assembly of the sarcomeric complex or/and for proper interactions between the recruited sarcomeric proteins (see below). This, in turn, would be necessary for the incorporation and assembly of newly formed myofibrils at the Z-discs, and for subsequent growth of the muscle fiber. This is consistent with our data showing that *perd*-depleted muscles are thinner than wild-type muscles, appear frayed and present gaps between myofibrils. In addition, we propose that Perd function in the assembly of a functional sarcomeric complex at Z-discs might also be required for correct sarcomeric organization. This is supported by our data demonstrating that diminished Perd levels results in sarcomere disorganization, as it is the case when different sarcomeric components, such as Zasp, α-actinin or Zipper, are reduced. Furthermore, reduction of integrin levels, while maintaining muscle attachment, causes the absence of H-zone similar to *perd*-depleted muscles (Bloor and Brown, 1998; Perkins et al., 2010; Rui et al., 2010). The interaction of Perd with the ECM at the Z-discs could enhance the tension transmitted through integrins that is necessary for subsequent interdigitation of thin and thick filaments. This could explain why lack of Perd results in abnormal sarcomeric banding and absence of the H-zone. Taken together, our results suggest a key role for Perd, after the initial steps mediated by integrins, which is essential for correct myofibrillogenesis and sarcomeric organization. However, we cannot completely rule out the fact that the initial myofibrillogenesis that takes place in *perd*-depleted muscles could be due to residual levels of Perd, and not just to the function of other important nucleating molecules, such as integrins. Thus, it remains possible that the role of Perd during adult myogenesis could be even more crucial and Perd, as is the case for integrins, might also be required for the initial steps of myofibril assembly.

Interestingly, we have found a genetic interaction between *perd* and integrins when simultaneously expressing the *perd* and *mys* RNAis. We found that both muscle orientation and attachment phenotypes were considerably increased when expressing simultaneously both RNAis compared to the expression of each RNAi alone. Although, the strong detachment phenotype due to the expression of both RNAis did not allow us to assess the sarcomeric structure, these results show that there is a genetic interaction between *perd* and integrins during the process of adult muscle myogenesis (supplementary material Fig. S4).

How could Perd regulate myofibrillogenesis and sarcomeric organization at the molecular level? Perd is a conserved chondroitin sulfate transmembrane proteoglycan that contains two extracellular laminin G domains and a small intracellular domain with a PDZ-binding consensus sequence, which serves as a linkage to PDZ protein networks. Interestingly, some of the proteins present at the Z-discs that are essential for Z-disc formation and myofibril assembly, such as Zasp52, Zasp66 and Zasp67 proteins, also contain a PDZ domain (Katzemich et al., 2011; Katzemich et al., 2013). Thus, Perd might function by regulating the localization of these PDZ-containing proteins. Here, we have tested the localization of Zasp66 in *perd*-depleted

muscles. We found that even though it localizes to the Z-bands of the few remaining myofibrils, there is a pool of cytoplasmic Zasp66 that is not observed in wild-type muscles. Thus, *Perd* could be required for proper recruitment of Zasp66 to the Z-discs, which in turn might regulate the assembly of new forming myofibrils and sarcomeric organization. Yet, we cannot differentiate whether the abnormal cytoplasmic levels of Zasp66 observed upon reduction of *perd* levels are a cause or an effect of defective myofibril assembly. In an alternative scenario, the interaction of *Perd* with sarcomeric PDZ containing proteins might not regulate directly their localization but it could interfere with their ability to interact with other sarcomeric proteins, thus compromising their function. Our results also show that Kettin, a *Drosophila* isoform of Titin, is not properly localized in *perd*-depleted muscles. As it is the case for vertebrate Titin isoforms, Kettin binds to α -actinin, actin and other proteins at the Z-disc through its N-terminus domain, while its long polypeptide chain exits the Z-disc and transverse the I-band to bind to the distal part of the thick filament (Machado and Andrew, 2000; Linke, 2008; Sparrow and Schöck, 2009). Here, we show that in *perd*-depleted muscles the H-zone seems to be absent. In addition, we find that while Kettin localizes properly at the Z-band it fails to extend toward the middle of the sarcomere. Thus, one way to explain the absence of the H-zone in *perd*-depleted muscles is that *Perd* could be required for the proper localization of Kettin along the thick filament, which in turn is required for proper filament interdigitation, and therefore the formation of the H-zone. However, it is difficult to elucidate whether the abnormal distribution of Kettin observed after the reduction of *perd* levels is an effect of defective sarcomeric architecture. In the future, it will be interesting to test, at both biochemical and genetic levels, the putative interactions between *Perd* and other proteins localized at the Z-discs. This will allow us to establish functional relationships and hierarchies between *Perd* and other sarcomeric proteins during myofibrillogenesis.

The identification and functional characterization of genes required for myofibril development and maintenance is key not only for our understanding of the myogenesis process but also for the diagnosis and treatment of some muscle diseases. Here, we have identified a new specific function for the gene *perd* in the assembly of myofibrils. We propose that *Perd* mediates the connection between the ECM and the structural myofibril components enabling the assembly of myofibrils. The function of *Perd* orthologs in rats, mice and humans (CSPG4, also known as NG2, AN2 and MCSP) has been mainly studied in glia and melanocytes, where they are required for cell proliferation, migration and adhesion. Interestingly, however, CSPG4 expression has also been observed in the sarcolemma and in the neuromuscular junction of human postnatal skeletal muscle, as well as in regenerating myofibers (Petrini et al., 2003). Moreover, CSPG4 is a marker of human pericytes, a type of myogenic precursors (Dellavalle et al., 2007; Meng et al., 2011). The expression of CSPG4 in muscle cells together with the fact that it is upregulated in Duchenne muscular dystrophy, and downregulated in merosin-deficient congenital muscular dystrophy (MDC1A) muscles, respectively (Petrini et al., 2003), suggest that *Perd* function in myofibrillogenesis might be conserved. The myriads of tools available to reduce the levels of a particular gene in a specific moment of development in other organisms, such as mice, *C. elegans* or zebrafish, will allow us to test this hypothesis in the near future.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila strains and genetics

Strain y^1w^{118} was used as control. The following stocks were used: tub-GAL80ts (7108), UAS-*Dicer* (24651) and UAS-*perd* RNAi JF01159 (31584) from Bloomington *Drosophila* Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Kettin-GFP (ZCL2144) from FlyTrap (<http://flytrap.med.yale.edu/>). UAS-*perd* RNAi (106680) and UAS-*mys* RNAi (29619) from Vienna *Drosophila* RNAi Center (<http://stockcenter.vdrc.at>). Zasp-GFP (110740) from *Drosophila* Genetic Resource Center (<http://www.dgcr.kit.ac.jp/>). Mef2-GAL4 (Ranganayakulu et al., 1996). UAS-*mCD8*-GFP (Lee and Luo, 1999). UAS-*rhea*-mCherry (Venken et al., 2011). UAS-*kon*-HA (Schnorrer et al., 2007). 1151-GAL4 was a gift from Lingadahalli S. Shashidhara (Centre for Cellular and Molecular Biology, Hyderabad, India). For transient expression assays, the different UAS lines were crossed with tub-GAL80ts; Mef2-GAL4 at 18°C, and the UAS expression was induced switching to 29°C. The temperature shift was made when larvae were between the first and the second larval stage, unless otherwise specified.

In vivo imaging of abdominal muscles

Pupae were staged as previously described (Bainbridge and Bownes, 1981). Pupae were filmed through a window in the pupal case as previously described (Bischoff and Cseresnyés, 2009). We focused our analysis on the dorsal side (tergite) of abdominal segment A2. All wild-type imaged flies developed into pharate adults and hatched. Z-stacks of around 70 μm with a step size of 2.5 or 3.0 μm were recorded every 150 or 180 s at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ using a Leica SP5 confocal microscope. Figures and videos were made using Adobe Illustrator and ImageJ (NIH, Bethesda).

Immunohistochemistry and microscopy

Pupae were cut longitudinally at 80–100 hours APF, unless otherwise specified. The dorsal parts of the abdomen were dissected in PBS, where the internal organs were gently removed. The dissected tissues were fixed in 4% paraformaldehyde in PBT (PBS containing 0.2% Triton X-100) for 20 minutes, washed in PBT for 30 minutes, and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Subsequently, the dorsal parts of the abdomen were washed, incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature, washed again for 30 minutes, and mounted in Vectashield (Vector Laboratories). The primary antibodies used were: rabbit anti-Zormin, 1:200 (gift from Belinda Bullard, University of York, UK); rabbit anti-GFP, 1:400 (Life Technologies); rat anti-RFP, 1:200 (Chromotek); rat anti-HA High Affinity, 1:400 (Roche); rabbit anti-HA, 1:1000 (Abcam); mouse anti- β PS, 1:100 (DSHB); and rat anti-MHC 1:400 (Babraham Bioscience Technologies). The secondary antibodies used were: goat anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 488, 1:200, goat anti-rat conjugated to Cy3 and goat anti-rat conjugated to Cy5, 1:200 (Life Technologies). Stainings with Rhodamine-Phalloidin, 1:1000 (Biotium) or Alexa-Fluor-488-Phalloidin, 1:1000 (Life Technologies) were made by incubating abdomens for 30 minutes at room temperature after secondary antibody incubation. The DNA dye TO-PRO 3 1:1000 (Molecular Probes, Life Technologies) was incubated for 10 minutes and washed just before mounting the samples. Confocal images were obtained using a Leica SP2 microscope and processed with ImageJ (NIH, Bethesda) and Adobe Photoshop. All the images shown are maximum intensity projections, unless otherwise specified.

Data analysis

In order to quantify the experimental phenotypes, we considered muscles to be misoriented when they showed a 45° -angle or greater with respect to the anterior–posterior axis of the abdominal segment. Moreover, we considered muscles as being detached when they presented a spindle or myospheroid shape. We obtained width measurements in the central region of each muscle.

We statistically compared differences in the variables of interest among the different genotypes. Because variables often did not meet parametric assumptions (i.e. did not show an underlying Gaussian error distribution or presented heteroscedasticity), we used non-parametric Mann–Whitney–Wilcoxon tests where only two genotypes were

compared. Data on proportion of misoriented or detached muscles were compared across genotypes fitting a generalized linear model with an underlying binomial error distribution and a logit link function. Statistical analyses were conducted using the R package (<http://www.r-project.org/>). Results from quantification of muscle phenotypes are shown on the figures so that bars indicate means and error bars indicate standard deviation. Different letters indicate statistical differences among genotypes so that bars marked with different letters are statistically different whereas bars marked with the same letter are not.

Quantitative PCR

y^1w^{118} (control), *perd* RNAi JF01159 and *perd* RNAi 106680 males were crossed with Mef2-GAL4 females at 18°C and switched to 29°C when larvae were between the first and the second larval stage. TRIzol reagent (Invitrogen) was used to isolate total RNA from late pupae. Subsequently, the total RNA was treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega). The DNA-free RNA was used to synthesize cDNA using SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen). qPCR was performed in a Mx3000P thermocycler (Stratagene) using Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Changes of the relative expression levels were determined by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Levels of *Perd* mRNA were normalized to RPL32 mRNA. Primer pairs: 5'-CCGCCAACAAATCCACTACT-3' and 5'-ATCGAATTGGAAACGCTTGT-3' for *Perd*; 5'-GCAAGCCCCAAGGGTATCGA-3' and 5'-CGATGTTGGGCATCAGATACTG-3' for RPL32.

Acknowledgements

We thank the Bloomington Stock Center, the Vienna Stock Center, and the FlyTrap Project for fly stocks. The Developmental Hybridoma Bank for antibodies. Eric Olson (University of Texas Southwestern Medical Center, USA), Hugo Bellen (Baylor College of Medicine, USA), Frank Schnorrrer (Max Planck Institute of Biochemistry, Germany), Liqun Luo (Stanford University, USA), Bellinda Bullard (University of York, UK), for flies and antibodies. Francisco J. García Rodríguez for initial experiments with the *perd* RNAi lines. Clara B. García-Calderón for technical assistance. Ivan Gómez-Mestre (Estación Biológica de Doñana, Spain) for help with the statistical analysis. Acaimo González-Reyes (CABD, Spain) and Inna Grosheva (CABD, Spain) for helpful comments on the manuscript. María C. Díaz de la Loza (CABD, Spain) for help with image analysis. Peter Lawrence (University of Cambridge, UK) in whose lab the *in vivo* imaging has been done.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author contributions

J.J.P.-M. co-designed and conducted most of the experiments, and contributed to the writing of the manuscript. M.B. conducted the *in vivo* imaging experiments. M.D.M.-B. co-designed some experiments, and contributed to the writing of the manuscript. B.E. supervised the project, designed the experiments, and wrote the manuscript.

Funding

Research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation [grant number BFU2011-26745]. B.E. was funded in part by the Ramon y Cajal program by the Universidad Pablo de Olavide; J.J.P.-M. was funded by the Proyecto de Excelencia de Junta de Andalucía; M.B. was funded by a Wellcome Trust Senior Investigator Award to Peter Lawrence [grant number WT096645MA]. M.D.M.-B. is funded by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Deposited in PMC for immediate release.

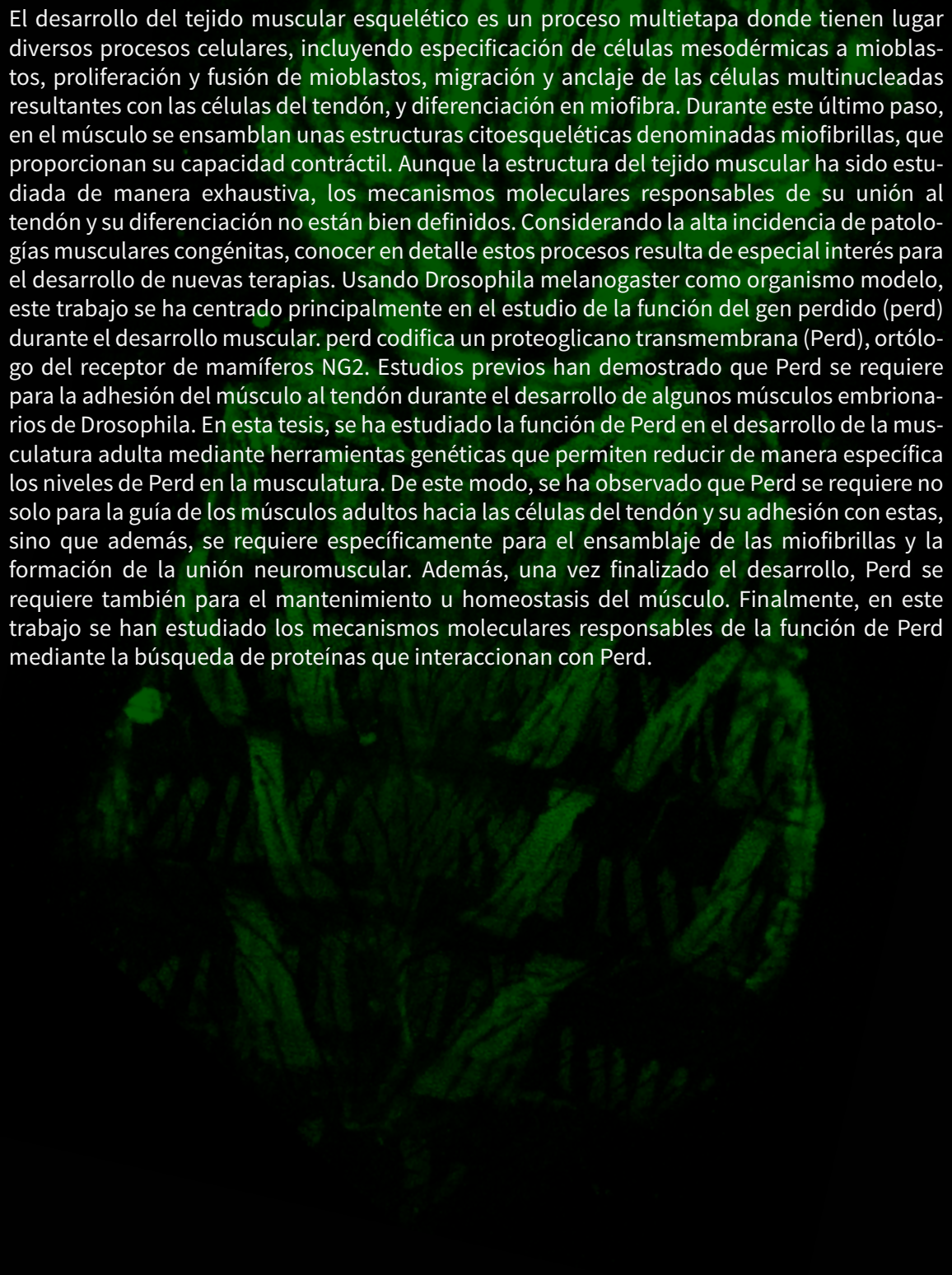
Supplementary material

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.150425/-DC1>

References

- Artero, R., Furlong, E. E., Beckett, K., Scott, M. P. and Baylies, M. (2003). Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during *Drosophila* myogenesis. *Development* **130**, 6257–6272.
- Bainbridge, S. P. and Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **66**, 57–80.
- Bate, M., Rushton, E. and Currie, D. A. (1991). Cells with persistent *twist* expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* **113**, 79–89.
- Beckett, K. and Baylies, M. K. (2006). The development of the *Drosophila* larval body wall muscles. *Int. Rev. Neurobiol.* **75**, 55–70.
- Bischoff, M. and Cseresnyés, Z. (2009). Cell rearrangements, cell divisions and cell death in a migrating epithelial sheet in the abdomen of *Drosophila*. *Development* **136**, 2403–2411.
- Bloor, J. W. and Brown, N. H. (1998). Genetic analysis of the *Drosophila* alphaPS2 integrin subunit reveals discrete adhesive, morphogenetic and sarcomeric functions. *Genetics* **148**, 1127–1142.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415.
- Bullard, B., Burkart, C., Labeit, S. and Leonard, K. (2005). The function of elastic proteins in the oscillatory contraction of insect flight muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**, 479–485.
- Chen, E. H. and Olson, E. N. (2004). Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*. *Trends Cell Biol.* **14**, 452–460.
- Currie, D. A. and Bate, M. (1991). The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express *twist* and are associated with nerves. *Development* **113**, 91–102.
- Dellavalle, A., Sampaioles, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B. G., Messina, G., Morosetti, R. et al. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 255–267.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S. et al. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151–156.
- Dutta, D., Shaw, S., Maqbool, T., Pandya, H. and Vijayraghavan, K. (2005). *Drosophila* Heartless acts with Heartbroken/Dof in muscle founder differentiation. *PLoS Biol.* **3**, e337.
- Ervasti, J. M. (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J. Biol. Chem.* **278**, 13591–13594.
- Estrada, B., Choe, S. E., Gisselbrecht, S. S., Michaud, S., Raj, L., Busser, B. W., Halfon, M. S., Church, G. M. and Michelson, A. M. (2006). An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes. *PLoS Genet.* **2**, e16.
- Estrada, B., Gisselbrecht, S. S. and Michelson, A. M. (2007). The transmembrane protein Perdido interacts with Grip and integrins to mediate myotube projection and attachment in the *Drosophila* embryo. *Development* **134**, 4469–4478.
- Holtzer, H., Hijikata, T., Lin, Z. X., Zhang, Z. Q., Holtzer, S., Protasi, F., Franzini-Armstrong, C. and Sweeney, H. L. (1997). Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. *Cell Struct. Funct.* **22**, 83–93.
- Hresko, M. C., Williams, B. D. and Waterston, R. H. (1994). Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **124**, 491–506.
- Hudson, A. M., Petrella, L. N., Tanaka, A. J. and Cooley, L. (2008). Mononuclear muscle cells in *Drosophila* ovaries revealed by GFP protein traps. *Dev. Biol.* **314**, 329–340.
- Jani, K. and Schöck, F. (2007). Zasp is required for the assembly of functional integrin adhesion sites. *J. Cell Biol.* **179**, 1583–1597.
- Katzemich, A., Long, J. Y., Jani, K., Lee, B. R. and Schöck, F. (2011). Muscle type-specific expression of Zasp52 isoforms in *Drosophila*. *Gene Expr. Patterns* **11**, 484–490.
- Katzemich, A., Kreisköther, N., Alexandrovich, A., Elliott, C., Schöck, F., Leonard, K., Sparrow, J. and Bullard, B. (2012). The function of the M-line protein obscurin in controlling the symmetry of the sarcomere in the flight muscle of *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **125**, 3367–3379.
- Katzemich, A., Liao, K. A., Czerniecki, S. and Schöck, F. (2013). Alp/Enigma family proteins cooperate in Z-disc formation and myofibril assembly. *PLoS Genet.* **9**, e1003342.
- Krzemien, J., Fabre, C. C., Casal, J. and Lawrence, P. A. (2012). The muscle pattern of the *Drosophila* abdomen depends on a subdivision of the anterior compartment of each segment. *Development* **139**, 75–83.
- Lee, T. and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451–461.
- Linke, W. A. (2008). Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc. Res.* **77**, 637–648.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta CT)$ Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Machado, C. and Andrew, D. J. (2000). D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J. Cell Biol.* **151**, 639–652.
- Meng, J., Adkin, C. F., Xu, S. W., Muntoni, F. and Morgan, J. E. (2011). Contribution of human muscle-derived cells to skeletal muscle regeneration in dystrophic host mice. *PLoS ONE* **6**, e17454.
- Mukherjee, P., Gildor, B., Shilo, B. Z., VijayRaghavan, K. and Schejter, E. D. (2011). The actin nucleator WASp is required for myoblast fusion during adult *Drosophila* myogenesis. *Development* **138**, 2347–2357.
- Peckham, M., Molloy, J. E., Sparrow, J. C. and White, D. C. (1990). Physiological properties of the dorsal longitudinal flight muscle and the tergal depressor of the trochanter muscle of *Drosophila melanogaster*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **11**, 203–215.

- Perkins, A. D., Ellis, S. J., Asghari, P., Shamsian, A., Moore, E. D. and Tanentzapf, G. (2010). Integrin-mediated adhesion maintains sarcomeric integrity. *Dev. Biol.* **338**, 15–27.
- Petrini, S., Tessa, A., Carrozzo, R., Verardo, M., Pierini, R., Rizza, T. and Bertini, E. (2003). Human melanoma/NG2 chondroitin sulfate proteoglycan is expressed in the sarcolemma of postnatal human skeletal myofibers. Abnormal expression in merosin-negative and Duchenne muscular dystrophies. *Mol. Cell. Neurosci.* **23**, 219–231.
- Ranganayakulu, G., Schulz, R. A. and Olson, E. N. (1996). Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **176**, 143–148.
- Rhee, D., Sanger, J. M. and Sanger, J. W. (1994). The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* **28**, 1–24.
- Ribeiro, I., Yuan, L., Tanentzapf, G., Dowling, J. J. and Kiger, A. (2011). Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance. *PLoS Genet.* **7**, e1001295.
- Rui, Y., Bai, J. and Perrimon, N. (2010). Sarcomere formation occurs by the assembly of multiple latent protein complexes. *PLoS Genet.* **6**, e1001208.
- Sanger, J. W., Kang, S., Siebrands, C. C., Freeman, N., Du, A., Wang, J., Stout, A. L. and Sanger, J. M. (2005). How to build a myofibril. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**, 343–354.
- Schejter, E. D. and Baylies, M. K. (2010). Born to run: creating the muscle fiber. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 566–574.
- Schnorrer, F., Kalchauer, I. and Dickson, B. J. (2007). The transmembrane protein Kon-tiki couples to Dgrip to mediate myotube targeting in *Drosophila*. *Dev. Cell* **12**, 751–766.
- Schönbauer, C., Distler, J., Jährling, N., Radolf, M., Dodt, H. U., Frasch, M. and Schnorrer, F. (2011). Spalt mediates an evolutionarily conserved switch to fibrillar muscle fate in insects. *Nature* **479**, 406–409.
- Schultheiss, T., Lin, Z. X., Lu, M. H., Murray, J., Fischman, D. A., Weber, K., Masaki, T., Imamura, M. and Holtzer, H. (1990). Differential distribution of subsets of myofibrillar proteins in cardiac nonstriated and striated myofibrils. *J. Cell Biol.* **110**, 1159–1172.
- Schweitzer, R., Zelzer, E. and Volk, T. (2010). Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development* **137**, 2807–2817.
- Sparrow, J. C. and Schöck, F. (2009). The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 293–298.
- Tskhovrebova, L. and Trinick, J. (2003). Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 679–689.
- Venken, K. J., Schulze, K. L., Haelterman, N. A., Pan, H., He, Y., Evans-Holm, M., Carlson, J. W., Levis, R. W., Spradling, A. C., Hoskins, R. A. et al. (2011). MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. *Nat. Methods* **8**, 737–743.
- Volk, T., Fessler, L. I. and Fessler, J. H. (1990). A role for integrin in the formation of sarcomeric cytoarchitecture. *Cell* **63**, 525–536.



El desarrollo del tejido muscular esquelético es un proceso multietapa donde tienen lugar diversos procesos celulares, incluyendo especificación de células mesodérmicas a mioblastos, proliferación y fusión de mioblastos, migración y anclaje de las células multinucleadas resultantes con las células del tendón, y diferenciación en miofibra. Durante este último paso, en el músculo se ensamblan unas estructuras citoesqueléticas denominadas miofibrillas, que proporcionan su capacidad contráctil. Aunque la estructura del tejido muscular ha sido estudiada de manera exhaustiva, los mecanismos moleculares responsables de su unión al tendón y su diferenciación no están bien definidos. Considerando la alta incidencia de patologías musculares congénitas, conocer en detalle estos procesos resulta de especial interés para el desarrollo de nuevas terapias. Usando *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, este trabajo se ha centrado principalmente en el estudio de la función del gen perdido (*perd*) durante el desarrollo muscular. *perd* codifica un proteoglicano transmembrana (*Perd*), ortólogo del receptor de mamíferos NG2. Estudios previos han demostrado que *Perd* se requiere para la adhesión del músculo al tendón durante el desarrollo de algunos músculos embrionarios de *Drosophila*. En esta tesis, se ha estudiado la función de *Perd* en el desarrollo de la musculatura adulta mediante herramientas genéticas que permiten reducir de manera específica los niveles de *Perd* en la musculatura. De este modo, se ha observado que *Perd* se requiere no solo para la guía de los músculos adultos hacia las células del tendón y su adhesión con estas, sino que además, se requiere específicamente para el ensamblaje de las miofibrillas y la formación de la unión neuromuscular. Además, una vez finalizado el desarrollo, *Perd* se requiere también para el mantenimiento u homeostasis del músculo. Finalmente, en este trabajo se han estudiado los mecanismos moleculares responsables de la función de *Perd* mediante la búsqueda de proteínas que interactúan con *Perd*.